

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMÁCIA

Maria Luiza Vieira e Vieira

**Detecção de *Chlamydia trachomatis* em mulheres
assintomáticas de 18 a 30 anos utilizando a autocoleta como
obtenção da amostra.**

Florianópolis
2016

Maria Luiza Vieira e Vieira

**Detecção de *Chlamydia trachomatis* em mulheres
assintomáticas de 18 a 30 anos utilizando a autocoleta como
obtenção da amostra.**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós- Graduação em
Farmácias da Universidade Federal
de Santa Catarina, como requisito
para a obtenção do Grau de Mestre
em Farmácia, área de concentração
Análises Clínicas: Desenvolvimento
de estratégias de diagnóstico e
monitoramento fisiopatológico e
terapêutico.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria
Luiza Bazzo

Florianópolis
2016

*Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de
água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.
Madre Teresa de Calcutá.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Maria Luiza Bazzo, pela confiança e por disponibilizar todos os recursos necessários ao desenvolvimento deste trabalho. Pelos conselhos éticos, profissionais e pessoais. Por me orientar e apoiar quando novas oportunidades surgiram em minha vida.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram para a elaboração deste trabalho. Gostaria de poder retribuir a todos que estiveram comigo durante esta caminhada, sem as quais eu não teria alcançado o meu objetivo. Em especial, gostaria de agradecer:

À colega Ma. Lisléia Golfetto e ao Eduardo Venâncio Alves pelos seus ensinamentos e suporte técnico antes e durante a realização da pesquisa. O auxílio de vocês foi essencial para a elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Natal Fedrizzi pelo apoio nas coletas de amostras clínicas e pelos conselhos científicos sobre o desenho do presente trabalho e estendendo minha gratidão às funcionárias de seu consultório de atendimento clínico pela organização e o apoio das coletas de amostras clínicas.

Ao Prof. e meu coorientador Luis Fernando Sommacal pelos conselhos científicos e clínicos, pela interação multiprofissional e pela realização de coletas de amostras clínicas.

Às enfermeiras Silvana Benedet e Silvana Maria Pereira pelo apoio às coletas de amostras clínicas e pelos ensinamentos e boas trocas de experiências.

Aos residentes da ginecologia do HU/UFSC pelos ensinamentos, troca de experiências e pelas coletas de amostras clínicas.

À enfermeira Luciana do Centro de Saúde do Itacorubi pela prontidão nas coletas de amostras clínicas e pelos seus ensinamentos.

Aos professores e professoras da UFSC, que me cederam alguns minutos de suas aulas, possibilitando a coleta de amostras das alunas universitárias.

Aos professores da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar esta dissertação.

Gostaria de agradecer de forma especial à Prof.^a. Dr.^a. Maria Cláudia Santos da Silva, que, assim como a atual chefe da Divisão de Análises Clínicas do Hospital Universitário da UFSC, permitiu a conciliação das atividades do mestrado com minhas funções no HU.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC.

Aos integrantes do Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias da UFSC pelos conselhos e momentos de descontração.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia do HU/UFSC, meus colegas diretos de trabalho, pelo suporte e pela flexibilidade de horários.

Às amigas do HU, Íris, Chandra, Camila, Mariangeles e Francine, com quem divido a vida profissional e também a pessoal, pelas pizzas e alfajores, pelas risadas e momentos de descontração, conselhos pessoais e científicos.

Às minhas primas e quase irmãs Raquel Lemos e Elisa Lemos pela companhia, correções e risadas durante a redação da dissertação.

Aos funcionários do LAMEB pelo auxílio e realização de experimentos.

À minha família, Toda a minha gratidão pelo amor, suporte e incentivo, e por tudo que já fizeram e ainda fazem por mim.

Ao meu marido, pelo amor, carinho e paciência. Obrigada pelo apoio nas horas mais difíceis e por compreender os momentos de ausência.

RESUMO

Chlamydia trachomatis (CT) é uma bactéria de vida intracelular obrigatória e principal causadora de infecção sexualmente transmissível bacteriana. Na maioria dos casos a infecção tem curso assintomático, consequentemente não é tratada. A progressão da infecção pode causar sérias complicações e sequelas, como a doença inflamatória pélvica (DIP), gravidez ectópica e infertilidade, representando uma grave ameaça à saúde da mulher. A infecção por CT é a segunda enfermidade que mais acomete as mulheres de 15 a 49 anos de idade nos países em desenvolvimento e a maior prevalência de CT é observada entre mulheres de 15 a 24 anos. No Brasil ainda não se tem um programa de rastreio e nem dados suficientes da prevalência de CT na população geral. O diagnóstico da infecção por CT é dificultado, por vezes, pela inadequação laboratorial e pela falta de sintomas específicos. Sua associação com a idade juvenil destaca o papel importante que o rastreio de mulheres sexualmente ativas desempenha na prevenção de comorbidades como a DIP e a infertilidade. O acesso a um método custo efetivo e com boa acurácia é necessário para reduzir as taxas de infecção. O advento das tecnologias de amplificação do ácido nucleico tem revolucionado a detecção de CT, pois permite o uso de autocoletas e coletas não invasivas, como *swab* de autocoleta vaginal. O objetivo do presente estudo foi determinar a prevalência da infecção por CT em estudantes universitárias de 18 a 30 anos em amostras de autocoleta vaginal analisadas por PCR multiplex. O estudo foi composto de duas etapas, um projeto inicial para padronizar a metodologia de detecção de CT por PCR multiplex em amostras de autocoleta vaginal e o rastreio da infecção por CT nas universitárias pela PCR multiplex padronizada. A PCR multiplex para o rastreio com amostras vaginais foi padronizada com sensibilidade de 83%, especificidade 100% e VPP 100%, VPN 92% e acurácia 94% e RP negativa 0,17 (acurácia moderada) em relação à qPCR (padrão-ouro). A prevalência de CT obtida entre as estudantes universitárias foi 3%; a detecção de CT foi mais comum entre a faixa de 20 a 23 anos de idade. Mulheres que tiveram com cinco ou mais parcerias sexuais ao longo da vida tiveram 76,5% mais chance de ter infecção por CT comparando-se com uma ou duas parcerias sexuais e foi encontrada correlação entre a fase de graduação avançada e o maior número de parcerias sexuais.

Palavras-chave: *Chlamydia trachomatis*, rastreio por autocoleta, *swab* vaginal, IST, PCR multiplex *in house*.

ABSTRACT

Chlamydia trachomatis (CT) is an intracellular bacteria and major cause of bacterial sexually transmitted infection. In most cases the infection is asymptomatic, and therefore not treated. The progression of the infection can result in serious complications and sequelae, such as pelvic inflammatory disease (PID), ectopic pregnancy and infertility, representing an important concern to of women's health. The CT infection is the second disease that affects often women among 15-49 years old in developing countries and higher CT prevalence is observed in adolescents and young adults (15 to 24 years). Brazil does not have a screening program and few data of CT prevalence is available. The diagnosis of CT infection is difficult by inadequate laboratory methods and the lack of specific symptoms. Its association with youth age highlights the important role to screening sexually active women to prevent comorbidities such as PID and infertility. To reduce infection rates, having an access to a cost effective method with good accuracy is required. The advent of nucleic acid amplification technology has revolutionized the detection of CT, and it allows the use of non-invasive sampling, such as self-collection vaginal *swab*. The aim of this study was to determine the CT prevalence infection in female university students aged 18-30 years with self-collected vaginal samples analyzed by multiplex PCR. The study was conducted in two stages; first, a beggining project to analyze the CT detection by multiplex PCR in self-collected of vaginal samples comparing to endocervical samples and with a commercial qPCR. The second stage was the screening for CT infection by multiplex PCR. The multiplex PCR for CT screening with vaginal samples had a sensitivity of 83%, specificity of 100%, PPV 100%, NPV 92%, accuracy 94% and negative likelihood ratios 0.17 (moderate accuracy) comparing to qPCR (gold standard). The CT prevalence of women university students was 3%; the higher CT detection was among those aged 20-23 years old. Risk factor for CT was multiple sex partners (five or more sexual partners had 76.5% more chance than those with one/two sexual partners). Correlation was found between the advanced university stage and the number of sexual partners.

Key words: *Chlamydia trachomatis*, self-collected vaginal *swabs*, *Chlamydia trachomatis* screening, IST, PCR multiplex.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Ciclo de vida bifásico e intracelular da *Chlamydia trachomatis* 31
- Figura 02.** Proporção das notificações de infecção por CT nos EUA em 2014, por faixa etária 45
- Figura 03.** S Taxas de notificação ao CDC (EUA) de casos de infecção por CT, por sexo e faixa etária em 2014 45
- Figura 04.** Prevalência de CT na população da Inglaterra em 2013, por gênero e grupo de idade. As maiores taxas são obesrvadas entre as idades de 15 a 24 anos 46
- Figura 05.** Detecção de CT no ano de 2014 na Inglaterra, por gênero e grupo de idade, a cada 100.000 pessoas. A taxa de infecção por CT foi maior nas mulheres que nos homens em geral 46
- Figura 06.** Notificações de infecção por CT por idade e sexo, a cada 100.000 habitantes na Austrália em 2011 47
- Figura 07.** Fluxograma de captação de amostras para o projeto teste 53
- Figura 08.** Fluxograma de captação de amostras para o rastreio da prevalência de *Chlamydia trachomatis* 54
- Figura 09.** Gel representativo das bandas de interesse nos testes para padronização da PCR multiplex para *Chlamydia trachomatis* 61
- Figura 10.** Gel representativo das bandas de interesse nos testes para padronização da PCR multiplex para *Chlamydia trachomatis* 62
- Figura 11.** Gel representativo das bandas de interesse nos testes para padronização da PCR multiplex para *Chlamydia trachomatis* 62
- Figura 12.** Gel representativo dos produtos da PCR para avaliação da sensibilidade de detecção do DNA de *Chlamydia trachomatis* 63
- Figura 13.** Frequência das idades das participantes incluídas no projeto teste 64

Figura 14. Gráfico da amplificação da curva padrão de DNA de CT em replicata com os valores obtidos de Ct (quantificações dos ciclos) na qPCR 66

Figura 15. Gráfico da reta obtida pela curva padrão, com as quantidades de DNA e os Cts (quantificações dos ciclos) correspondentes da curva padrão e de cada amostra testada na reta obtida pela curva padrão 67

Figura 16. Gráfico evolução dos ciclos da qPCR das amostras avaliadas 68

Figura 17. Idades por faixa etária e detecção de *Chlamydia trachomatis* entre as gestantes incluídas no projeto teste 70

Figura 18. Frequência de universitárias participantes do rastreio de CT por curso de graduação 71

Figura 19. Idades das universitárias participantes do rastreio de *Chlamydia trachomatis* 72

Figura 20. Frequência da detecção de CT por faixa etária entre as universitárias participantes do rastreio de *Chlamydia trachomatis* 73

Figura 21. Gráfico da frequência (%) dos níveis de consumo de álcool entre as universitárias participantes do rastreio de *Chlamydia trachomatis* 74

Figura 22. Gráfico das frequências absolutas das infecções vaginais por outros microrganismos 75

Figura 23. Gráfico das frequências (%) do número total de parcerias sexuais ao longo da vida, entre as universitárias participantes do rastreio de CT 78

Figura 24. Frequência do número total de parcerias sexuais por detecção de CT entre as universitárias participantes do rastreio de CT 78

Figura 25. Frequência das idades de início da atividade sexual entre as universitárias participantes do rastreio de *Chlamydia trachomatis* 79

Figura 26. Frequência da idade de início da atividade sexual por detecção de *Chlamydia trachomatis* (CT) entre as universitárias participantes do rastreio de CT

LISTA DE QUADROS

Quadro 01. Relação dos Centros de ensino e seus respectivos cursos do
Campus Trindade/UFSC

55

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Avaliação das amostras endocervicais incluídas no projeto teste	64
Tabela 02. Avaliação das amostras endocervicais e vaginais pareadas por PCR multiplex no projeto teste	65
Tabela 03. Curva padrão de DNA de <i>Chlamydia trachomatis</i> e os valores respectivos de Ct (quantificações dos ciclos) obtidos na qPCR	66
Tabela 04. Comparação do resultado das mesmas amostras vaginais avaliadas por qPCR e PCR multiplex	69
Tabela 05. Comparação dos índices de qualidade dos resultados das amostras vaginais por qPCR e por PCR multiplex	69
Tabela 06. Frequência de universitárias participantes do rastreio de <i>Chlamydia trachomatis</i> por fase do curso de graduação	72
Tabela 07. Frequência do uso de tabaco e do consumo de álcool entre as universitárias participantes do rastreio de <i>Chlamydia trachomatis</i>	74
Tabela 08. Relação entre infecção vaginal por outros microrganismos e exame preventivo prévio alterado com a detecção de CT entre as universitárias participantes do rastreio	76
Tabela 09. Presença de corrimento vaginal e o uso de preservativos em relação à detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i>	77

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

μL - Microlitros
μM - Micrômetros
ATP - Trifosfato de adenosina
CCB – Centro de Ciências Biológicas
CCE – Centro de Comunicação e Expressão
CCJ – Centro de Ciências Jurídicas
CCS – Centro de Ciências da saúde
CDC - *Center of Disease Control*
CDS – Centro de Desportos
CE - Corpo elementar
CED – Centro de Ciências da Educação
CEPSH - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CFH – Centro de Filosofia e Ciências Humanas
CFM – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
CHSP60 - do inglês, *Chlamydial heat shock protein 60* - proteína do choque térmico clamidiana 60
CR – Corpo reticular
CSE – Centro Sócio-Econômico
CT – *Chlamydia trachomatis*
Ct - *threshold cycle* - quantificações dos ciclos
CTC – Centro Tecnológico
DACL – Divisão de Análises Clínicas
DIP - Doença inflamatória pélvica
DNA - Ácido Desoxirribonuclêico
FDA – *Food and drug administration*
FITC - Anticorpos monoclonais marcados com isotiocianato de fluoresceína
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
HPV - Papiloma vírus humano
HSM - Homens que fazem sexo com homens
HSP60 - do inglês, *heat shock protein 60*
HU – Hospital Universitário Professor Polyodoro Ernani de São Thiago
IFD - Imunofluorescência direta
IFN-γ - Interferon gama
IgA – Imunoglobulina A
IL-1 – Interleucina 1
IST - Infecção sexualmente transmissível
kb – Quilo base
LAMEB - Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia

LBMM - Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias
LCR - Reação em Cadeia da Ligase
LGV - Linfogranuloma venéreo
LPS - Antígeno lipopolissacarídico
mL – Mililitros
mM – Milimol
MOMP - do inglês, *major outer membrane protein* - membrana externa principal
MS - Ministério da Saúde
NAAT - do inglês, *nucleic acid amplification tests* - Testes de detecção de ácidos nucleicos
NF- κ B – Fator nuclear
nm - Nanômetros
nvCT - Nova variante de CT Sueca
OMS - Organização Mundial da Saúde
ORF - do inglês *open reading frame* - fases de leitura aberta
pb – Pares de base
PCAP - Conhecimentos, Atitudes e Práticas na População Brasileira
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
R2 - Coeficiente de correlação
REACT - Retest after CT trial
RNA – Ácido Ribonuclêico
RP - razão de probabilidade negativa - ou razão de verossimilhança (likelihood ratios)
SDA - Amplificação por deslocamento de cadeia
SINAN – Sistema de informação de agravos de notificação
SMS - Mensagem de texto pelo celular
SPSS - Statistical Package for Social Sciences
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLR - do inglês, *Toll like receptors* - receptores do tipo Toll
TMA - Amplificação mediada por transcrição
TNF- α – Fator de necrose tumoral
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
VPN - Valor preditivo negativo
VPP - Valor preditivo positivo
WHO - *World Health Organization*
xg – Força gravitacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Objetivo.....	25
1.2 Objetivos específicos	25
1.3 Hipótese	25
1.4 Justificativa	26
 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	 29
2.1 Chlamydia trachomatis	29
2.2 Infecções por CT e Tratamento	35
2.3 Diagnóstico laboratorial	38
2.4 Rastreo e prevalência da CT	42
 3 METODOLOGIA.....	 51
3.1 Aspectos éticos.....	51
3.2 Tipo, local e período do estudo	51
3.3 Coleta e processamento das amostras biológicas	51
3.3.1 Projeto Teste:.....	52
3.3.2 Rastreo para determinar a prevalência de CT entre as universitárias.....	53
3.4 Testes laboratoriais.....	55
3.4.1 Pesquisa de CT por Imunofluorescência Direta (IFD)	55
3.4.2 PCR multiplex para detecção de CT	56
3.4.2.1 Extração do DNA da CT	56
3.4.2.2 Amplificação do DNA de CT por PCR multiplex.....	57
3.4.3 PCR em tempo real para CT (qPCR)	58
3.5 Metodologia de Análise de dados.....	59
 4 RESULTADOS	 61
4.1 PADRONIZAÇÃO DA PCR multiplex.....	61
4.1.1 Amostragem no projeto teste.....	63
4.1.2. Acurácia da Imunofluorescência Direta para CT	64
4.1.3 Avaliação das amostras vaginais no projeto teste	65
4.1.4 Acurácia da PCR multiplex	65
4.1.4.1 Curva padrão.....	66
4.1.4.2 Análise das amostras por qPCR.....	67

4.1.5	Prevalência de CT entre as gestantes atendidas nos serviços de emergência do HU/UFSC.....	70
4.2	<i>Resultados do estudo da Prevalência entre as Estudantes da UFSC</i>	<i>71</i>
5	DISCUSSÃO	81
6	CONCLUSÕES.....	92
7	PERSPECTIVAS.....	94
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
	ANEXO	123

1 INTRODUÇÃO

Chlamydia trachomatis (CT) é uma bactéria intracelular obrigatória (MPIGA, RAVAOARINORO, 2006), Gram negativa e imóvel (SCHACHTER, 1985), capaz de infectar diversos tipos de células e tecidos no ser humano, podendo causar infecção ocular, anorretal, faríngea e um considerável número de infecções urogenitais (SCHACHTER, 1978; CATES, WASSERHEIT, 1991; HAGGERTY *et al.*, 2010; REKART *et al.*, 2013) e artrite reacional em ambos os gêneros (HUDSON *et al.*, 2013).

A infecção sexualmente transmissível (IST) por CT, na maioria dos casos, tem curso assintomático, consequentemente não é tratada, podendo progredir para sérias complicações e sequelas, como a doença inflamatória pélvica (DIP), salpingite, gravidez ectópica, dor pélvica crônica e infertilidade, representando uma grave ameaça à saúde da mulher (FROMMELL, *et al.*, 1979; HAGGERTY *et al.*, 2010; REKART, *et al.*, 2013, SCHACHTER, 1978). Além disso, a persistência da CT pode durar meses e ou até mesmo anos (AFRAKHTEH *et al.*, 2013; FAIRLEY *et al.*, 2007; HOGAN *et al.*, 2004; MPIGA, RAVAOARINORO, 2006; WYRICK, 2010).

A mulher infectada por CT durante a gestação está mais sujeita a partos prematuros e a abortos. Nos casos de transmissão vertical - transmissão da mãe para o bebê na passagem pelo canal do parto - o recém-nascido corre maior risco de desenvolver conjuntivite e pneumonia (Agencia Brasil, 2011; BORBOREMA-ALFAIA *et al.*, 2013; FROMMELL *et al.*, 1979; SCHACHTER, 1978).

A infecção por CT é a segunda enfermidade que mais acomete as mulheres de 15 a 49 anos de idade nos países em desenvolvimento segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS, sendo reconhecida como um dos maiores problemas de saúde pública. Mundialmente ocorrem cerca de 50 milhões de casos novos por ano (WHO, 2013). Nos Estados Unidos é de notificação compulsória e está entre as ISTs mais prevalentes. Desde 1994 tem constituído a maior proporção de todas as ISTs notificadas ao *Center of Diseases Control and Prevention* (CDC, 2013). A maior prevalência de infecção por CT é observada entre adolescentes do sexo feminino e sua associação com a idade juvenil destaca o papel importante que o rastreio de mulheres sexualmente ativas desempenha na prevenção da infertilidade (WHO, 2013).

O rastreio anual de indivíduos sexualmente ativos para a infecção por clamídia já está sendo implementado em muitos países. O CDC recomenda que todas as mulheres sexualmente ativas com idade inferior a 26 anos sejam rastreadas anualmente por métodos moleculares, devido à alta carga de doenças de risco associadas com a infecção, e as graves e profundas consequências da infecção por clamídia em mulheres (SU et al., 2011), (CDC, 2013). O CDC (2015) recomenda também o rastreio de mulheres abaixo de 35 anos e homens abaixo de 30 anos que vivem em penitenciárias.

A Inglaterra, Canadá e Escócia passaram a adotar programas de rastreamento, cujos resultados foram bastante satisfatórios, com redução da taxa de doença inflamatória pélvica (AHRQ, 2007; NCSSG, 2006) e, enorme economia de recursos para a saúde pública com os custos diretos e suas sequelas (HOOVER, TAO, KENT, 2010). Custos médicos diretos de infecções por CT foram estimados em 516 milhões de dólares em 2008, sendo a CT a IST com maiores custos excetuando-se as IST virais (OWUSU-EDUSEI et al., 2013). Também são de grande importância ou maior, os custos tangíveis, incluindo a perda de produtividade e os custos intangíveis, incluindo danos psicológicos e emocionais provocados pela infertilidade e gravidez ectópica (BLANDFORD, GIFT, 2006).

No Brasil não existem estudos documentando a situação global da infecção e nem programas de rastreio para a infecção por CT. Estão disponíveis apenas estudos isolados em populações específicas, mas que mostram a importância dessa infecção silenciosa em nosso meio (CODES et al., 2002; DI FELICE et al., 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011b e 2011c).

Os testes para detecção de ácidos nucleicos (NAATs - do inglês, *nucleic acid amplification tests*) têm adquirido importância por apresentarem sensibilidade e especificidade suficientes para serem utilizados em amostras não invasivas como a urina ou coletadas com *swabs* vaginais e uretrais pelo próprio paciente (autocoleta), especialmente quando se objetiva o diagnóstico de pessoas assintomáticas e a adesão do paciente ao diagnóstico (GAYDOS et al., 2006). Quando analisadas por NAAT, as amostras de conteúdo vaginal obtidas por autocoleta são equivalentes em sensibilidade e especificidade às coletadas por um clínico (KNOX et al., 2002; MASEK et al., 2009; MICHEL et al., 2007; SCHACHTER et al., 2007; SCHACHTER et al., 2003; SHAFER et al., 2003) e essa estratégia de rastreio é altamente aceita pelas mulheres (DOSHI et al., 2008; HSIEH et al., 2003; SCHACHTER et al., 2005).

1.1 Objetivo

Determinar a prevalência da infecção por CT em mulheres assintomáticas de 18 a 30 anos utilizando a autocoleta como obtenção da amostra clínica, seguida de amplificação do DNA bacteriano por Reação da Cadeia em Polimerase (PCR).

1.2 Objetivos específicos

- Adequação da PCR (reação em cadeia da polimerase) para o diagnóstico de CT com as amostras endocervicais e de conteúdo vaginal obtidas por autocoleta;
- Adequação da reação de PCR multiplex para amplificação de segmentos de genes de CT e da betaglobina humana;
- Avaliar a qualidade dos resultados da detecção de CT por imunofluorescência direta (IFD) em relação aos da PCR multiplex em amostras endocervicais;
- Avaliar a qualidade dos resultados da detecção de CT por PCR multiplex de amostras endocervicais e de conteúdo vaginal obtidas por autocoleta em relação ao padrão-ouro, PCR em tempo real (qPCR);
- Determinar a prevalência de CT nas gestantes, acima de 18 anos, que procuraram o serviço de emergência obstétrica do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.
- Determinar a prevalência de CT em mulheres, de 18 a 30 anos, em uma população universitária por meio do rastreio com amostras de conteúdo vaginal obtidas por autocoleta;
- Verificar dados comportamentais da população estudada e possíveis fatores de risco e para a infecção por CT entre as universitárias, identificados em questionário autoaplicável.

1.3 Hipótese

A reação de PCR multiplex padronizada no presente estudo é adequada para a realização do rastreio de CT em mulheres assintomáticas entre 18-30 anos de idade com amostras de autocoleta de conteúdo vaginal.

1.4 Justificativa

Devido à alta carga de doenças de risco associadas com a infecção e ao curso assintomático da infecção por CT, o rastreio anual de CT por métodos moleculares de todas as mulheres jovens sexualmente ativas já é recomendado em países como: Inglaterra, Canadá, EUA e Austrália, por exemplo (AHRQ, 2007; CDC, 2015; NCSSG, 2006).

Sem um método de rastreio a maioria dos casos das infecções por CT não serão tratadas. A identificação precoce da infecção por CT pelos clínicos é dificultada porque os sintomas são inespecíficos e a sensibilidade e especificidade de muitos métodos de diagnóstico laboratoriais utilizados podem variar.

O diagnóstico de CT pode ser dificultado pela inadequação laboratorial (OMS, 2007) e o acesso a um método custo efetivo e com boa acurácia é necessário para reduzir as taxas de infecção. O advento das tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos tem revolucionado a detecção de CT, pois permite o uso de amostras não invasivas (autocoleta vaginal e urina) (HOCKING et al., 2013). Já está bem estabelecida a superioridade da sensibilidade das técnicas moleculares no rastreio da infecção genital por CT (RIDGWAY et al., 1996; SCHATCHTER, PHILIP et al., 2011; SKULNICK et al., 1994). Essas técnicas também são aceitas e recomendadas para rastreio de infecção anorretal (SCHATCHTER et al., 1995; PHILIP et al., 2011).

As taxas anuais de triagem de CT passaram de 25% em 2000 para 41% em 2007 e muitos estudos demonstraram que o rastreio é custo-efetivo, porém mais da metade das mulheres jovens sexualmente ativas não são rotineiramente triadas. O rastreio de IST realizado por coletas feitas em casa pode aumentar significativamente a detecção de CT em relação à coleta tradicional feita por profissionais de saúde. A adesão das mulheres para o rastreio de ISTs no consultório clínico e o rastreio realizado em casa aumenta de 32% para 65%, respectivamente (EIDE, DEBAQUE, 2012; POLJAK et al., 2012).

Apesar do aumento na proporção de mulheres grávidas testadas na Nova Zelândia, o rastreio pré-natal geral para CT permanece abaixo do ideal. Diversas estratégias são apresentadas para justificar o rastreamento universal na gravidez, porém a taxa média de rastreio em quatro grandes hospitais foi de apenas 38% (WISE, SADLER, EKEROMA; 2015).

Programas de rastreio de clamídia demonstraram reduzir as taxas de DIP (BACHMANN et al., 2010; BRUNHAM; REKART, 2009; MIMIAGA et al., 2008). Embora o rastreio por autocoleta previna mais casos de complicações como a DIP que o rastreio em clínica independentemente da prevalência da infecção por CT, a economia financeira com gastos para o tratamento da DIP acontece quando a prevalência de CT é maior que 6%. Esse dado é válido considerando-se a taxa de DIP sintomáticas, entretanto há um desacordo entre os estudiosos sobre a real taxa de DIP (HUANG et al., 2011). Wiesenfeld e colaboradores demonstraram que 23% das mulheres com infecção por CT cursavam com DIP subclínica (MARRA et al., 2009).

Um estudo polonês realizado entre 2010-2013 dividiu 543 participantes em dois grupos. O grupo 1 incluiu 190 pacientes com idade entre 23-39 anos, em que testes de controle foram realizados no planejamento da gravidez; o grupo 2 incluiu 353 pacientes também com idade entre 23-39 anos que sofrem de infertilidade. A infecção por CT foi detectada em 18 (9,47%) do grupo 1, e em 81 (22,95%) participantes do grupo 2. Os autores indicam que a infecção crônica por CT pode representar um fator significativo, resultando em infertilidade da mulher. Um teste para a infecção por CT deve ser realizado rotineiramente em todos os casais com infertilidade diagnosticada (CHUDZICKA-STRUGALA, 2014).

Embora as evidências sejam insuficientes para recomendar o rastreio de rotina para CT em homens jovens sexualmente ativos por causa de vários fatores (por exemplo, a viabilidade e relação custo-benefício), o rastreio de homens jovens sexualmente ativos deve ser consideradas em contextos clínicos com alta prevalência de CT (CDC, 2007; HOSELFELD et al., 2009) . Entre as mulheres, os focos principais do rastreio devem ser a detecção e prevenção de complicações da infecção por CT, e testar e tratar suas parcerias sexuais (BACHMANN et al., 2009; SEXTON et al., 2013).

A falta de controle de infecções por clamídia se reflete em quatro fatores: muitos casos são assintomáticos ou com sintomas inespecíficos (CATES, WASSERHEIT, 1991; OMS, 2007); os testes de diagnóstico são caros e tecnicamente exigentes; pelo menos sete dias de terapia de dose múltipla são atualmente necessários; e a notificação do parceiro não é realizada rotineiramente. Assim, a identificação precoce de pessoas infectadas e o seu subsequente tratamento não são realizados frequentemente (CATES, WASSERHEIT, 1991).

O Brasil ainda não tem um programa de rastreio, e poucos dados sobre a prevalência de CT em populações assintomáticas e do estado de

Santa Catarina foram documentados. O método de detecção de CT rotineiro utilizado no HU/UFSC em Florianópolis era a IFD, como em muitos laboratórios de atendimento à rede SUS. Ainda, este hospital possui um laboratório com estrutura adequada para a realização de técnicas moleculares, condicionando a detecção de CT por PCR e a realização do rastreio de CT na população universitária.

Os resultados do presente estudo contribuirão com dados de prevalência de CT em mulheres jovens sexualmente ativas em Florianópolis, da validação da autocoleta como forma de obtenção da amostra clínica seguida de identificação molecular para detecção de infecção por CT. Podem-se avaliar critérios para a criação de protocolos de rastreio de infecção por CT no grupo estudado, bem como uma avaliação do custo-benefício do rastreio de CT. Estima-se que a identificação de fatores de risco e o conhecimento do comportamento sexual e hábitos de vidas da população estudada contribuirão para o desenvolvimento de medidas preventivas e de educação sexual.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Chlamydia trachomatis*

A CT é uma bactéria patogênica intracelular obrigatória incapaz de sintetizar ATP (trifosfato de adenosina), dependendo da energia da célula hospedeira para se replicar (MANAVI, 2006). Os corpos de inclusão de CT foram descritos pela primeira vez em 1942; a CT foi primeiro cultivada em gemas de ovos por Tang Fei-fan e colaboradores em 1957 (DARUGAR, 1972).

As clamídias são classificadas na ordem das Chlamydiales, da família Chlamydiaceae, do gênero *Chlamydia* e é subdividido em quatro espécies: CT, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. pecorum*, todas patogênicas para o ser humano (CHOROSZY-KRÓL et al., 2012).

O genoma da CT é formado por um cromossomo circular com cerca de um mega base (mb) e um plasmídeo, denominado de plasmídeo críptico, de 7,5 quilo bases (kb) (STEPHENS et al., 1998). Os plasmídeos isolados de CT são extremamente conservados, com menos de 1% de variação na sequência de nucleotídeos, apresentam oito ORFs (fases de leitura aberta, do inglês *open reading frame*) intercaladas por quatro sequências curtas não codificantes de 22 pares de base em tandem na origem de replicação (COMANDUCCI et al., 1990; TAM et al., 1992; SETH-SMITH, et al., 2009).

O papel do plasmídeo da CT vem sendo relatado nos estudos recentemente. O plasmídeo codifica oito proteínas, é um regulador da transcrição de genes cromossômicos e um fator de virulência (CARLSON et al., 2008; VAN BUEREN et al., 2007; NGUNYEN; VALDIVIA, 2012). Cepas com deleção do plasmídeo são incapazes de acumular glicogênio em suas inclusões essa propriedade está estreitamente associada com um fator de virulência (CARLSON et al., 2008). Outros potenciais fatores de virulência já descritos foram, por exemplo, um sistema secretor de proteínas efetoras tipo III que proporciona o controle da interação com a célula hospedeira e o desenvolvimento inclusão pela clamídia (KLEBA [amp] STEPHENS, 2008; ROCKEY et al., 2000). Hudson (2013) revisou os estudos publicados sobre este assunto, e conclui que ainda não estão claros quais os genes interferem, direta ou indiretamente, na patogênese ou persistência da infecção por CT, todavia a identificação de genes relacionados à virulência da CT indica que os pesquisadores estão na direção da elucidação das suas funções.

Diferentemente dos demais procariotos, a CT apresenta duas unidades gênicas controladas por sequências regulatórias comuns (*operons*) (COMANDUCCI, 1990; MOULDER, 1991; SCHACHTER, STAMM, 1999; CHOROSZY-KRÓL et al., 2012).

A clamídia pode trocar DNA entre as suas diferentes linhagens, assim, a evolução de novas estirpes é comum (HARRIS et al., 2013). Em 2006, foi feito o primeiro relatório de uma evolução genética, e uma estirpe de CT que ficou conhecida como a nova variante sueca (nvCT) foi relatada (RIPA, NILSSON, 2006; UNEMO, 2011). A nvCT sofreu uma mutação e perdeu um pequeno segmento de DNA a partir do seu plasmídeo, precisamente a região usada em vários testes moleculares comerciais (NAATs) para detecção de CT. Portanto, os casos positivos não foram detectados e a infecção, não tratada (UNEMO et al., 2010). Estudos moleculares, epidemiológicos e clínicos detalhados concluíram que a nvCT não tinha adquirido quaisquer novos fatores de virulência, e sua rápida propagação foi principalmente por causa da falta de tratamento. Um estudo clínico chave também mostrou que a nvCT produziu sintomas reduzidos nas mulheres (BJARTLING et al., 2009), os protocolos de detecção. Novos testes NAATs foram rapidamente implementados e uma importante lição foi aprendida: dois alvos de regiões do genoma altamente conservado devem ser selecionados para diagnóstico molecular (CLARKE, 2011).

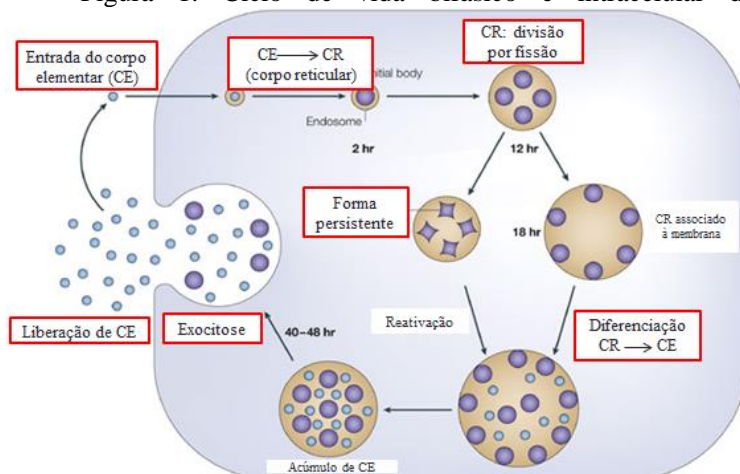
As espécies de CT são classificadas em 15 sorovares principais de acordo com a imunotipagem da proteína de membrana externa principal (MOMP – do inglês, *major outer membrane protein*) ou da análise do gene *ompA* (HARRIS et al., 2012; NUNES et al., 2013). Os 15 sorovares são divididos em dois biotipos causadores de doenças distintas: tracoma e linfogranuloma venéreo (LGV). Sorovares tracoma estão subdivididos por local de infecção: oculares – A, B, Ba e C; anogenitais – D a K. Sorotipos LGV – L1, L2 e L3, além de sexualmente transmissíveis, são invasivos, resultando numa infecção disseminação de nódulos linfáticos regionais de drenagem (HARRIS et al., 2012; NUNES et al., 2013; SCHACHTER, 1978). Entre os sorovares anogenitais (D a K), os sorovares G são mais comuns nas infecções anorretais e os demais nas infecções urogenitais (BARNES et al., 1987; MORRE et al., 2000; KLINT et al., 2006; BAX et al., 2011; BOM et al., 2013).

Estudos trazem a diferença entre os sorovares mais prevalentes em infecções em heterossexuais - D, E e F- e em homens que fazem sexo com homens (HSH) – D, G e J – (BOM et al., 2013; QUINT et al., 2011) provavelmente advinda de comportamentos sexuais e por

participarem de diferentes redes de relacionamento. Entretanto, não houve diferença encontrada entre as cepas de CT de diferentes sítios anatômicos (faringe, geniturinário e anorretal) (VERSTEEG, et al., 2014). O tropismo tecidual de CT ocorre nas cepas de CT ocular, mas não nas urogenitais (MORRISSON, 2000; NELSON et al., 2005).

O ciclo de vida da CT tem desenvolvimento bifásico, porém, único (HACKSTADT et al., 1997). A forma infecciosa é chamada de corpo elementar (CE), que é captada por fagocitose pelas células epiteliais (BYRNE, MOULDER, 1982). Após a internalização celular, o CE é envolto por um endossomo formando uma inclusão, permitindo que o CE se torne metabolicamente ativo, denominado, a partir de então, de corpo reticular (CR). O CR se multiplica por divisão binária. Dentre 40-48 hrs, os CRs retornam para sua forma metabolicamente inativa de CE (TODD, CARDWELL, 1985), que são liberados da inclusão para infectar células vizinhas. Ainda, pode formar uma inclusão persistente de CE na presença de fatores inibidores de crescimento, como *interferon* gama ($IFN-\gamma$). Se retirado o inibidor, os CEs voltam à forma infecciosa CR (FIELDS, HACKSTADT, 2002). A Figura 1 ilustra o ciclo de vida da CT.

Figura 1. Ciclo de vida bifásico e intracelular da CT.



FONTE: adaptado de BRUNHAM, REY-LADINO, 2005. CE: corpo elementar; CR: corpo reticular; CT: *Chlamydia trachomatis*

A resposta imune contra as principais ISTs no trato genital feminino ocasionalmente não oferece proteção adequada e não é capaz de promover memória de forma eficiente, permitindo que quadros de reinfecção se estabeleçam em curtos períodos de tempo (MABEY; PEELING, 2002).

A reação inflamatória causada pela infecção por CT é caracterizada pelo influxo de células da imunidade inata (macrófagos e neutrófilos) e pela indução de sítios imunes na submucosa, semelhantes aos folículos linfoides de outras mucosas (BRUNHAM; REY-LADINO, 2005; MURAILLE; LEO, 1998). Esses sítios contêm linfócitos T e B, macrófagos, células dendríticas que coordenam o início de uma imunidade adquirida, incluindo a produção de anticorpo IgA secretor. Durante a infecção pela bactéria CT, há um aumento na expressão de moléculas de adesão, como a madcAm-1 e a VcAm-1, no epitélio das tubas uterinas, o que favorece a migração de células imunes e a formação de um sítio imune (BRUNHAM; REY-LADINO, 2005).

A indução de resposta de células T CD4+ específicas com perfil de citocinas do tipo Th1 está associada à proteção contra a infecção por CT e por outros patógenos intracelulares, principalmente pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como o IFN- γ , que inibe a replicação desse microrganismo dentro das células epiteliais da cérvix. Entretanto, esses mecanismos estão também intimamente relacionados com a indução de patogênese e dano tecidual durante a infecção persistente por CT, como a fibrose das tubas uterinas (BRUNHAM; PEELING, 1994; GOTTLIEB et al., 2010; KELLY, 2003; LOOMIS, STARNBACH, 2002; MACCELLINO et al., 2011). Ainda, a ativação de células T CD4+ com perfil de citocinas do tipo Th2 favorece a proliferação de *Candida albicans*, além de prejudicar a resposta contra bactérias intracelulares e vírus (JEREMIAS et al., 1998; KELLY, 2003), entre eles o HIV (vírus da imunodeficiência humana).

Assim como outras IST, a CT pode aumentar a susceptibilidade à infecção pelo HIV, devido ao aumento de linfócitos e outras células imunes CD4+ (células alvo do HIV) na ectocérvix e na zona T durante uma infecção, do aumento de citocinas inflamatórias como o TNF- α (fator de necrose tumoral) e a IL-1 (interleucina 1), que favorecem a replicação do HIV nas células infectadas pela indução de NF- κ B (fator nuclear), ou mesmo da ativação celular no trato genital por meio dos receptores TLR-2 e TLR-4 - TLRs (receptores do tipo Toll, do inglês, Toll like receptors) expressos por células da imunidade inata, como as células fagocíticas, os macrófagos, células NK e as células dendríticas, bem como pelas células epiteliais (EQUILS et al., 2001; MENON et al.,

2015; PUDNEY et al., 2005; QUAYLE, 2002; STURM-RAMIREZ et al., 2000; WIRA et al., 2005).

A capacidade que CT tem em induzir a fagocitose em células epiteliais favorece sua atuação sem que os mecanismos de defesa sejam prontamente ativados. Essa forma lenta e progressiva de infectar a célula confere à infecção por clamídia um caráter silencioso e insidioso na grande maioria dos casos (GIRALDO, 2000).

Em relação à infecção por CT, o termo persistência é definido com um estágio de desenvolvimento em que a bactéria é viável, mas não infecciosa, por isso, o uso do termo persistência pode ser confuso, visto que é utilizado na clínica para se referir a uma infecção de longo prazo em um hospedeiro. A viabilidade da clamídia na sua fase persistente permite que ela seja detectada por testes NAATs. O ciclo celular da clamídia pode se alterar na presença de estímulos específicos e então divergir no seu ciclo de desenvolvimento para um estado de persistência (HOGAN et al., 2004; LEONHARDT et al., 2007; WOOD et al., 2011; WYRICK, 2010). Quando uma célula hospedeira infectada é carente de vários nutrientes tais como aminoácidos (por exemplo, triptofano) (LEONHARDT et al., 2007; WOOD et al., 2011), de ferro, ou vitaminas, causa uma consequência negativa para CT, uma vez que a bactéria depende da célula hospedeira para dispor estes nutrientes. O metabolismo da divisão e diferenciação dos CR em CE é diminuído, reduzindo a divisão celular e produção de corpos infecciosos (CE) e estimula a formação de corpos aberrantes, morfologicamente anormais. Este estado também é reversível, após a retirada dos estímulos inibidores, organismos persistentes permanecem viáveis e são capazes de retornar a um estado normal de crescimento (HOGAN et al., 2004; LEONHARDT et al., 2007; MPIGA, RAVAOARINORO, 2006; WOOD et al., 2011; WYRICK, 2010). Coortes de longo prazo indicam que aproximadamente 50 % das pessoas infectadas eliminam a bactéria dentro de um ano, 80 % no prazo de dois anos, e 90 % no prazo de três anos (FAIRLEY et al., 2007).

Este estado de desenvolvimento da clamídia adaptado para causar infecções crônicas ainda não está bem elucidado (HOGAN et al., 2004; WYRICK, 2010). Shoborg (2013) revisou os estudos publicados sobre a infecção persistente de CT e destaca que muitas questões ainda não foram elucidadas, por exemplo, se a persistência de CT avaliada *in vitro* é a mesma *in vivo* e, se for, qual é a implicação dessa persistência no organismo humano.

Durante a infecção persistente por clamídia, corpos elementares aberrantes produzem grandes quantidades de proteína do choque

térmico clamidiana 60 (CHSP60 - do inglês, *Chlamydial heat shock protein 60*), altamente antigênicas (GIRALDO, 2000; STEPHENS, 2003). O acúmulo dessas proteínas, dentro e fora da célula infectada, promove a ativação da resposta imune específica mediada por células B e T, e receptores TLRs (AGRAWAL, 2007; STEPHENS, 2003).

As CHSP60 são muito semelhantes com as HSP60 (heat shock protein 60) humanas, produzidas por hospedeiros infectados e em situações de estresse (GIRALDO, 2000). Essa semelhança permite que o processo inflamatório local permaneça ativo mesmo quando já não existe mais a presença da bactéria, quando o organismo pode produzir suas próprias HSP60 sob uma situação de estresse (GIRALDO, 2000). Ambas podem promover um efeito pró-apoptótico, ativando da cascata das caspases, levando à morte celular (DI FELICE et al., 2005). Entretanto, para evadir-se do sistema imune, as CHSP60 citoplasmáticas podem impedir a ativação da cascata das caspases, interagindo com a Caspase-3 ou, assim como as HSP60, podem se ligar a Bax ou Bak no citoplasma celular, bloqueando a capacidade de induzir apoptose *in vitro* (KIRCHHOFF, GUPTA e KNOWLTON, 2002; DI FELICE et al., 2005; ALLAN; CLARKE, 2009).

A presença de mutações ou proteínas oncogênicas juntamente com a produção de CHSP60-1 pode cooperar para a inibição da senescência celular (controle da divisão de células anormais) e apoptose causando a proliferação de células anormais e causando dano tecidual. Portanto, a infecção por CT pode levar ao câncer quando células são infectadas simultaneamente por oncovírus ou são danificadas por agentes carcinogênicos (DI FELICE et al., 2005). A correlação entre a infecção por CT e o desenvolvimento do câncer cervical foi avaliada por Wallin e colaboradores (2002). Foram identificados 118 casos que posteriormente desenvolveram carcinoma cervical invasivo e dentre esses 10 (8%) apresentaram DNA de clamídia. Dentre os controles, nenhum foi positivo para CT. A maioria dos pacientes desenvolveu câncer no período de 3 a 6 anos após a infecção por clamídia, contudo a presença concomitante do DNA do HPV (papiloma vírus humano) era fator necessário para o desenvolvimento do câncer.

Panatto e colaboradores (2014) avaliaram a coinfeção por CT e HPV em amostras vaginais. As mulheres positivas para o DNA-HPV tinham chances significativamente maiores de estarem infectados com CT (*odds ratio* de 4,20) em comparação com as HPV negativas. A coinfeção CT/HPV e apenas a CT foram mais prevalentes em jovens com menos de 18 anos. Amostras positivas para HPV de alto risco foram mais comuns em amostras de coinfeção com CT.

2.2 Infecções por CT e tratamento

A infecção das células colunares da cérvice uterina pelos corpos elementares de CT geralmente causa pouco ou nenhum sintoma (70 a 90% nas mulheres) (PEIPERT, 2003; STAM, 2007). A infecção pode ascender e atingir o endométrio e as tubas uterinas, causar DIP (doença inflamatória pélvica) e oclusão tubária, que podem acarretar em infertilidade irreversível ou gravidez ectópica (FROMMELL, et al., 1979; HAGGERTY et al., 2010; REKART, et al., 2013, SCHACHTER, 1978). Dados de países desenvolvidos indicam que mulheres que tiveram DIP têm probabilidade seis a 10 vezes maior de desenvolver gravidez ectópica. Nos países em desenvolvimento, as DIP contribuem com mais de 15% das mortes maternas (WHO, 2007).

O real processo imunológico dos fatores do hospedeiro e do patógeno que resultam em infertilidade permanecem incertos e exigem mais investigação. Embora existam vários mecanismos convincentes apresentados para explicar esta ocasional patologia da interfertilidade, o processo real e os fatores tanto do hospedeiro e quanto do patógeno que resultam em infertilidade permanecem incertos e exigem mais investigação (MENON et al., 2015).

A infecção por CT em homens também pode ser silenciosa (em torno de 50% dos casos) (NHS, 2015) e trazer consequências, como uretrite, epididimite e obstrução nos dutos do aparelho reprodutor masculino que podem evoluir para infertilidade (GREENDALE et al., 1993; HAGGERTY *et al.*, 2010; REKART *et al.*, 2013; WAGENLEHNER et al., 2006). A clamídia é também uma causa potencial de inflamação da próstata nos homens, embora a sua relevância exata é de difícil determinação devido à possível presença de uretrite (WAGENLEHNER et al., 2006).

Quando existem sintomas, os mais comuns entre homens são febre, dor ou ardor ao urinar, aumento do número de micções (urgência urinária), presença de secreção fluida ou descarga, dor testicular ou inchaço (CREIGHTON et al., 2003; CDC, 2015; WAGENLEHNER et al., 2006) e artrite reativa (CDC, 2015). Nas mulheres, dor ou ardor ao urinar, aumento do número de micções, presença de secreção fluida ou descarga, perda de sangue nos intervalos do período menstrual, dor durante as relações sexuais, dor no baixo ventre e doença inflamatória

pélvica, erosões cervicais com abundante secreção mucopurulenta (CREIGHTON et al., 2003; YEUNG et al., 2015).

A CT pode causar também infecção anorretal e seu impacto na saúde da mulher ainda não foi bem estudado. Sugere-se que seu tratamento pode diminuir as fontes de infecção para a população bem como a reinfecção da mulher, pois serve de reservatório para repetidas infecções pela bactéria (BARRY et al., 2010), e pode progredir para proctocolite (BOISVERT et al., 1999; QUINN et al., 1981).

Outra grave infecção por CT é o tracoma, que afeta a parte superior interna da pálpebra e da córnea e é uma das causas mais comuns de cegueira infecciosa. A doença começa como uma infecção da pálpebra e evolui para triquíase tracomatosa e cegueira devido à opacidade da córnea (WHO, 2005). A infecção ocular geralmente ocorre em um folículo unilateral e não é autolimitada e de curto prazo como encontradas em outras infecções oculares bacterianas (BORBOREMA-ALFAIA et al., 2005; LINDQUIST, 2011). Infecções oculares podem resultar na conjuntivite em recém-nascidos e adultos (JONES et al., 1964). A infecção por CT na gestação está relacionada com partos prematuros, baixo peso do bebê, e endometrite puerperal (SCHACHTER, STEPHENS, 2008).

Artrite reativa sexualmente adquirida também tem sido relatada como uma possível consequência da infecção CT (CARTER, HUDSON, 2010).

Quando a infecção por CT for detectada, ambos os parceiros sexuais devem ser notificados e tratados, a fim de se evitar reinfecções (CDC, 2015; Expert Advisory Group, 1998; MALHOTRA et al., 2013). O tratamento do(a) parceiro(a) pode ser prescrito, no momento da consulta, ao paciente, e este entrega ao seu parceiro(a), mesmo sem que o médico o(a) tenha avaliado (CDC, 2015). Embora essa prática seja recomendada, deve ser averiguado se ela é permitida pela legislação local. No Brasil, o médico deve pedir que o parceiro com diagnóstico de IST avise seu parceiro para que este procure o atendimento médico (BRASIL, 2006).

O tratamento depende do local da infecção, a idade do paciente, e se há outra infecção concomitante. A infecção por CT pode ser tratada com vários medicamentos antibióticos. As diretrizes atuais recomendam a azitromicina, doxiciclina, eritromicina ou ofloxacina (GILBERT, 2011; MALHOTRA et al., 2013). Agentes recomendado para mulheres grávidas incluem azitromicina, eritromicina ou amoxicilina (AMERICAN FAMILY PHISICIAN, 2006; MALHOTRA et al., 2013). Muitos estudos mostraram que o tratamento com dose única de

azitromicina 1g para infecção anorretal falha em 40% dos casos. Nos Estados Unidos e na Inglaterra é recomendado adicionar doxiciclina por sete dias junto à azitromicina dose única de 1g (DRUMMOND et al., 2011; DUKERS-MUIJERS, et al., 2013).

Se a infecção progrediu, ascendendo para o trato reprodutivo, ou nos casos de DIP, a infecção por CT deve ser tratada em nível ambulatorial com ofloxacina, levofloxacina, ceftriaxona, cindamicina, doxiciclina com ou em metronidazol. O tratamento da infecção ocular por CT em neonatos se faz com eritromicina. É importante salientar que se deve tratar a mãe de uma criança com CT ocular (CDC, 2010; MALHOTRA et al., 2013).

Sem dúvida, as situações de falha do tratamento podem ocorrer, mas estas são provavelmente por razões farmacológicas (por exemplo, o paciente não completou o ciclo de tratamento) ou possivelmente devido à reinfeção. Há relatos na literatura de CT resistentes a antibióticos (macrolídeos e tetraciclinas), mas não há marcadores genéticos consistentes com estas observações (BHENGRAJ et al., 2010; SAMRA et al., 2001).

Após o diagnóstico de infecção por CT, o(a) paciente deve se abster de atividade sexual durante 7 dias após antibióticos de dose única ou até à conclusão de um curso de 7 dias de antibióticos, para evitar a propagação da infecção. Embora a medicação cesse a infecção, não irá reparar qualquer dano permanente feito pela CT. Se os sintomas continuarem por mais do que alguns dias depois de receber tratamento, o (a) paciente deve ser reavaliado (CDC, 2015).

A repetição do teste diagnóstico 3-4 semanas após completar o tratamento para detectar falha terapêutica não é aconselhável para pessoas tratadas com esquemas recomendados, a menos que a adesão terapêutica tenha sido duvidosa, ou os sintomas persistirem, ou se suspeite de reinfeção. Além disso, o uso de testes moleculares em menos de 3 semanas após o término do tratamento não é recomendado porque ainda pode haver organismos não viáveis, levando a resultados falso-positivos (CDC, 2009; PAPP et al., 2014; RENAULT et al., 2011). Retestagem durante a gravidez pode ser realizada três semanas após o tratamento. Se o risco de reinfeção é alta, o rastreio pode ser repetido durante toda a gravidez (CDC, 2010; MALHOTRA et al., 2013).

Repetidas infecções por CT após tratamento são comuns e podem ocorrer por inadequada adesão ou falha do tratamento, reinfeção da mesma parceria sexual ou de uma nova parceria (BATTEIGER et al., 2010). Dentro de um estudo prospectivo com mulheres de 16-24 anos no Reino Unido, a taxa de reinfeção detectada foi 29,9% por ano após o

tratamento (SCOTT et al., 2007); na Austrália, a taxa encontrada foi 22,3% após 12 meses em um coorte de 1.116 mulheres (WALKER et al., 2012). Reinfecções por CT aumentam o risco de sequelas, como doença inflamatória pélvica e infertilidade, quando comparadas com a infecção inicial (HAGGERTY et al., 2010). Entre HSM, a reinfecção está associada com aumento do risco de soroconversão do HIV (BERNSTEINS et al., 2010). Em 2014, Smith e colaboradores iniciaram na Austrália o primeiro ensaio clínico para avaliar a efetividade da autocoleta amostral combinada com um lembrete via mensagem de texto pelo celular (SMS) para a repetição do teste diagnóstico após 3 meses da infecção por CT – o REACT (*Retest after CT trial*), e avaliar o custo-benefício desta técnica. Dentre os fatores que incentivaram esse estudo, uma metanálise demonstrou que o envio de *kits* de coleta de amostras enviados por correio aumentou em torno de 30% a taxa de retestagem para CT (GUY et al., 2012).

2.3 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico clínico da infecção por CT ainda é um desafio, pois a maioria das infecções é assintomática e mesmo os casos sintomáticos podem não ser identificados devido à semelhança dos sintomas com outras ISTs, por isso, o diagnóstico laboratorial deve ser considerado, especialmente nos programas de rastreio (CDC, 2015; HOCKING et al., 2013; PAPP et al., 2014).

Historicamente, muitos métodos diagnósticos para CT têm sido utilizados na prática clínica laboratorial, como a cultura celular, imunofluorescência direta e ensaio imunoenzimático, e, atualmente, encontram-se disponíveis técnicas de hibridização e amplificação dos ácidos nucleicos (NAATs), sendo o método de escolha para o diagnóstico dessa infecção, independente da situação clínica (BARBEYRAC, 2013). Os testes sorológicos que detectam uma resposta imune sistêmica à infecção não são recomendados devido à falta de precisão para a detecção de uma infecção ativa e resultados às vezes discrepantes (CDC, 2014). Não devem ser utilizados para o rastreio porque uma infecção anterior pode ou não provocar uma resposta imune adquirida sistêmica (MABEY, PEELING, 2002).

A metodologia padrão-ouro para o diagnóstico da CT já foi a cultura celular, entretanto com a rápida evolução dos testes de amplificação do DNA (PCR, por exemplo), houve a reavaliação desse padrão na comunidade científica. Os métodos moleculares se mostraram

mais sensíveis e reprodutíveis (BUIMER et al., 1996; FRIAS et al., 2001; OLIVEIRA, 2007).

A cultura celular é um método diagnóstico muito preciso e específico e possibilita a realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos (MANAVI, 2006). Porém, seu custo extremamente elevado, variabilidade entre laboratórios, a necessidade de utilização de técnicas sofisticada com meios de cultura em células vivas, possibilidade de contaminação e perda da cultura, além do tempo de cultivo, tornam este método inviável na prática clínica (BUIMER et al., 1996; FRIAS et al., 2001; OLIVEIRA, 2007).

A técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) consiste na utilização de anticorpos monoclonais com fluorescência, é um dos métodos mais empregados para identificação de CT em laboratórios que não podem utilizar a cultura celular ou metodologia molecular (MEDEIROS, et al., 2007). A visualização direta das estruturas antigênicas da clamídia pode ser realizada utilizando-se anticorpos monoclonais fluorescentes dirigidos aos CR e CE. Além disto, a IFD possibilita avaliar simultaneamente a adequação da amostra. Apesar de ser antigenicamente complexa, são dois os antígenos mais relacionados ao diagnóstico e à patogênese da infecção por essa bactéria. São eles: o antígeno lipopolissacarídico (LPS), mais encontrado no RB, constituído principalmente por ácido cetodeoxietanóico; e o antígeno da *major outer membrane protein* (MOMP). Os antígenos da MOMP são espécie e subespécie-específicos; por isso são utilizados para a sorotipagem (caracterização realizada através de painel de anticorpos monoclonais (LAND, et al., 2009; SEADI, et al., 2002).

A IFD tem uma sensibilidade em torno de 80-85% e uma especificidade de 98% em relação à cultura quando ambas são realizadas em condições ótimas (FRIAS et al., 2001; LAND, et al., 2009; MEDEIROS, et al., 2007; SEADI, et al., 2002). A desvantagem do método é a necessidade de um microscopista treinado e a dificuldade em se processar um grande número de amostras. A experiência na interpretação da imunofluorescência é fundamental, porque a ligação inespecífica do anticorpo a outros microrganismos pode ocorrer, levando a resultados falso-positivos (SEADI, et al., 2002).

A Captura Híbrida é uma técnica baseada em sondas de RNA complementar a uma sequência de DNA específica e amplificação do sinal de detecção. Para o diagnóstico de CT, a sonda de RNA é complementar à sequência completa do plasmídeo críptico da CT (7.500 pb). O híbrido DNA-RNA formado pela ligação da sonda com a sequência do plasmídeo da CT é capturado por anticorpos específicos

que vão gerar um sinal (GIRDNER et al., 1999). A sensibilidade do teste de captura híbrida para a CT varia de 95,4 a 97,2% em relação à PCR (Amplicor CT-PCR, Roche) e a especificidade é superior a 99,0% em amostras cervicais (VAN DER POL et al., 2002).

Países em desenvolvimento e regiões que não têm laboratórios equipados com tecnologia de NAAT podem pensar na utilização de testes rápidos – os *Point of Care tests* (POC) – por serem de fácil uso e baixo custo (MAHILUM-TAPAY, 2007). Segundo os critérios da OMS (WHO, 2011) devem ser ferramentas de baixo custo, com alta sensibilidade e especificidade, de fácil uso, processo rápido e com equipamento compacto (HUPPERTY et al., 2010). Apesar das baixas sensibilidades (50-85%) de diferentes imunoenaios para teste rápido de CT disponíveis, podem ser mais eficazes em populações de alto risco (VICKERMAN et al., 2003) e o tratamento pode ser dado na visita inicial, minimizando a transmissão da CT (MAHILUM-TAPAY, 2007). Su e colaboradores (2011) desenvolveram um imunoenensaio múltiplo por microchip, aumentado a sensibilidade do teste rápido e mantendo o baixo custo. Apesar de os testes rápidos serem mais simples que os NAATs, precisam ser melhorados na sua sensibilidade.

Para o diagnóstico de clamídia, os testes moleculares são baseados em diferentes tecnologias que amplificam regiões específicas de ácido nucléico (NAATs), incluem PCR e qPCR (PCR em tempo Real), Reação em Cadeia da Ligase (LCR) amplificação por deslocamento de cadeia (SDA), amplificação baseada na sequência de amplificação mediada por transcrição (TMA), detecção de RNAr. Eles têm como alvo sequências gênicas da MOMP, do plasmídeo críptico ou do RNAr da CT. Os testes que amplificam genes que apresentam inúmeras cópias em uma célula bacteriana apresentam sensibilidade superior, como é o caso do plasmídeo críptico de CT, o qual está presente na ordem de sete a 10 cópias por corpo elementar e do RNAr (MANAVI, 2006).

A amplificação de DNA ou RNA consiste na obtenção de milhares de cópias de um segmento de DNA a partir de *primers* (iniciadores) de uma sequência de DNA-alvo. Os *primers* definem as regiões de DNA a serem amplificadas e a especificidade da técnica (XIA et al., 2007). A sensibilidade destes testes NAATs para detecção de CT é em torno de 20% - 30% maior do que demais técnicas de cultura, imunofluorescência direta e enzimoimunoensaio e não da viabilidade da amostra, (GOLDENBERG et al., 2008; HOCKING et al., 2013; OSTERGAARD, 1999) e possuem alto desempenho (sensibilidade maior que 90% e especificidade superior a 99%. Embora

mais caros, aumentam a capacidade de diagnóstico desta infecção (NOVAIS, ALVES, 2004; XIA et al., 2007). Através da PCR pode-se detectar até uma única partícula plasmídica de CT. (XIA et al., 2007). As desvantagens estão relacionadas com a necessidade de uma estrutura laboratorial elaborada e o seu desempenho reduzido quando há presença de inibidores na amostra, como nas amostras urinárias (estrógeno, nitratos e cristais) (MANAVI, 2006).

Com o advento dos NAATs para o diagnóstico de infecção por CT, diversas amostras de sítios anatómicos mais distantes do local de origem da infecção podem ser utilizadas (por exemplo, urina, para uma infecção cervical), anteriormente inadequadas, e ainda, colhidas pelos próprios pacientes e (HOCKING et al., 2013). As recomendações mais atuais do CDC são da utilização de um método NAAT em amostras de *swab* vaginal para mulheres e urina para homens; para infecções anorretais e faríngeas, o uso de NAATs não está aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*), embora os recomende por causa de sua alta sensibilidade, desde que o laboratório faça seu modelo de procedimento padrão (CDC, 2014).

Devido à alta sensibilidade, diversos estudos avaliaram a detecção da clamídia por amplificação de ácido nucleico de autocoletas de conteúdo vaginal realizadas com um *swab*, onde a própria mulher faz a sua coleta. Foram relatadas sensibilidades comparáveis as de raspado endocervical – de 93,8% a 98% e especificidade entre 96% e 99% (HOCKING et al., 2013).

Chernesky e colaboradores (2014) compararam a detecção de CT quatro testes de NAATs de segunda geração. Foram testadas amostras de *swab* vaginal por autocoleta e de urina (primeiro jato) de 575 mulheres. A prevalência encontrada foi de 9%. As amostras de conteúdo vaginal indicaram mais infecções do que as urinárias em todos os ensaios, com sensibilidades dos testes de 84,6 - 98,1% contra 75,5 - 88,7% nas amostras urinárias. Sensibilidade dos testes com amostra vaginal: 98,1% Tigre; 96,2% APTIMA Combo2; 98,0% qPCR CT/NG Abbot; 90,6% ProbeTec CT/GC; 84,6% Cobas CT/NG. Sensibilidades espécimes urinárias: 88,7% Tigre; 88,0% Panther Aptima2; 76,9% qPCR CT/NG; 75,5% ProbeTec CT/GC; 81,1% CT/NG Cobas. Especificidades para ambas as infecções variou de 98,4 a 100%. As diferenças de sensibilidade analítica e níveis de alvos moleculares, mas não a presença de inibidores de amplificação, pode explicar as diferenças de sensibilidades nos testes utilizados em amostras clínicas. Observações semelhantes para estes dois tipos de amostras com os ensaios individuais foram feitas em vários outros estudos

(CHERNESKY et al., 2006; GAYDOS et al., 2003; SCHACHTER et al., 2005; VAN DER POL et al., 2013).

Um grande número de NAAT *in house* para a detecção de CT foram relatados (OSTERGAARD, 1999). A maioria destes são revelados em gel (BOBO et al., 1990; HOLLAND et al., 1992; ROYMANS et al., 1996), são manuais e utilizam sistemas abertos com etapas separadas para a amplificação e análise do *amplicon*. Devido ao risco de contaminação e falta de automação, estes ensaios são inadequadas para os laboratórios de diagnóstico com altas cargas de trabalho (OSTERGAARD, 1999).

Assim como outras amostras clínicas, deve-se considerar a chance de erro pré-analítico que resultam em erro no resultado final laboratorial. Amostragens incorretas, bem como a contaminação podem ser esperadas também em amostras de autocoleta vaginal (STEWART et al., 2007).

A qPCR é realizada num sistema fechado, amplificação e detecção do alvo são realizadas num único passo, e existe o potencial para automação (PICKET et al., 2005; STORM et al., 2005). É uma técnica capaz de monitorar o progresso da PCR enquanto a amplificação acontece, ao invés da quantidade de alvo acumulado após um número fixo de ciclos (ponto final). O resultado deste método se baseia na detecção do número do ciclo na qual a amplificação de um alvo ultrapassa o limite de detecção denominado *cutt-off/ threshold* (Ct). Quanto maior o número de cópias iniciais do ácido nucleico alvo, menor será o número de ciclos necessários para a amplificação superar o limite de detecção (BUSTIN, 2004).

Jalal e colaboradores (2006) desenvolveram uma qPCR multi alvo (multiplex - MTR-PCR) para a detecção, identificação, e quantificação de CT em uma única reação. Três alvos de amplificação foram usados: o plasmídeo críptico para a detecção qualitativa, o gene MOMP para a quantificação do DNA, e um controle interno para a detecção de inibidores de amplificação.

2.4 Rastreio e prevalência da CT

A autocoleta de material vaginal é bem aceita pelas mulheres e pela comunidade clínica para o rastreio de CT (DOSHI et al., 2008; HOCKING et al., 2013; HUANG et al., 2011; PAPP et al., 2014; SCHACHTER et al., 2005); e o primeiro jato urinário é o preferencial para os homens (PAPP et al., 2014). Um estudo avaliou a adesão ao *kit*

de autocoleta com *swabs* vaginais (mulheres) e uretrais (homens), a maioria das mulheres (75,7%) deu preferência em realizar a autocoleta da amostra em sua casa do que ir até uma clínica (16,1%) ou consultar seu próprio médico (8,2%) (GRASECK et al., 2010). Os pesquisadores observaram que a opção da autocoleta em casa foi associada a um aumento significativo na adesão aos programas de triagem e retestagem daquelas mulheres positivas (JENKINS et al., 2011). Conejero e colaboradores (2013) relataram que 98% de 344 participantes disseram que a explicação sobre a autocoleta de conteúdo vaginal é de fácil compreensão e 87% se sentiram confortáveis em realizá-la.

Em comparação com os adultos, adolescentes e jovens sexualmente ativos (entre 15-24 anos de idade) têm maior risco de adquirir doenças sexualmente transmissíveis por uma combinação de razões comportamentais, biológicas (como a ectopia) e culturais (TILSON et al., 2004) e as maiores prevalências de CT são encontradas nessa faixa etária (AHRQ, 2007; AUSTRALIA, 2011; CDC, 2015; CHRISTIAN et al., 2005; GOLFETTO et al., 2011; KAMWENDO et al., 1996; LAN et al., 2008 NCSSG, 2006; SCHOLES et al., 1996; TILSON et al., 2004; 2008; UK, 2015).

Uma causa biológica é a ectopia cervical, mesmo que seja um achado normal em mulheres adolescentes e jovens, aumenta a suscetibilidade a infecções. Ectopia refere-se à exposição de células colunares da zona T, que estão normalmente localizados dentro do canal cervical, sendo localizadas na superfície exterior do colo do útero (BRABIN et al., 2005; TILSON et al., 2004). O trato genital feminino pode ser dividido em seis sítios anatômicos distintos: o intróito vaginal, a vagina e a ectocérvice apresentam tecido epitelial estratificado; e a endocérvice, o útero e as tubas uterinas, epitélio colunar simples. Entre os epitélios ecto e endocervicais, existe uma região com transição abrupta de um tipo de epitélio para outro, denominada zona de transição ou zona T (BRABIN et al., 2005). A zona T é o provável sítio inicial de infecções virais, como as causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e pelo papilomavírus humano (HPV); e bacterianas, como CT (AHMED et al., 2001; PUDNEY et al., 2005; SCHIFFMAN et al., 2007).

A infecção genital por clamídia ocorre principalmente em populações jovens e está fortemente associada ao comportamento sexual de risco (TILSON et al., 2002). Na população em geral, a prevalência da infecção pela bactéria varia de 1,0-12% (CHRISTIAN et al., 2005; LAN et al., 2008), e pode chegar a 35% em populações vulneráveis, como profissionais do sexo (DIALLO et al., 1998; WHO, 2007),

pessoas com baixo nível socioeconômico (WHO, 2005), população negra (MONTEIRO et al., 2005).

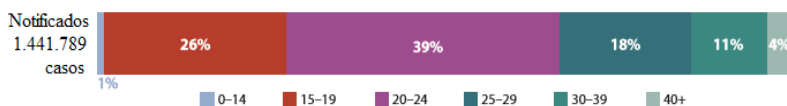
A maior prevalência de doenças sexualmente transmissíveis entre adolescentes também pode refletir várias barreiras ao acesso a serviços de prevenção e gestão de qualidade das ISTs, incluindo a incapacidade de pagamento, falta de transporte, longo tempo de espera, os conflitos entre horas na clínica e horários de trabalho e escolares, o método de coleta de amostras, e as preocupações sobre confidencialidade (TILSON et al., 2004).

Os casos de infecção por CT representam o maior número de casos de notificações (AUSTRALIA, 2012; CDC, 2015; UNITED KINGDOM, 2015). Ainda poucos países realizam rotineiramente o rastreamento para infecção por CT. O CDC preconiza o rastreamento de rotina para CT em gestantes e em todas as mulheres sexualmente ativas entre 15 e 25 anos de idade e a infecção por CT é de notificação compulsória nos Estados Unidos (CDC, 2010).

A Suíça foi o primeiro país a colocar em prática os programas de rastreamento em 1982 (LOW, 2007). Outros países, como Canadá, Austrália, Inglaterra e Escócia, passaram a adotar programas de rastreamento, cujos resultados foram bastante satisfatórios, como redução da taxa de doença inflamatória pélvica (AHRQ, 2007; KAMWENDO et al., 1996; NCSSG, 2006; SCHOLLES et al., 1996).

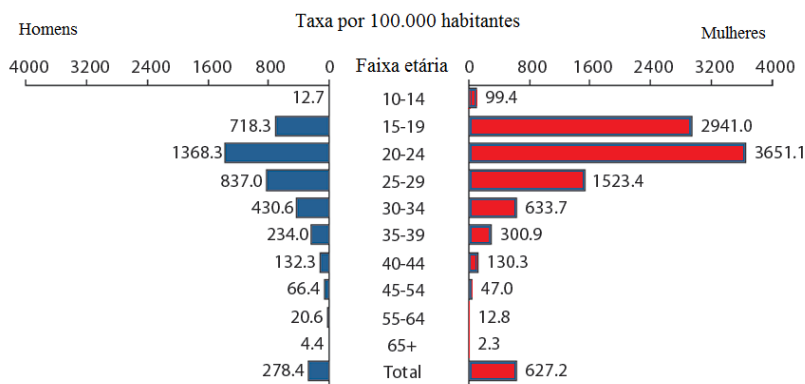
As estimativas de incidência e prevalência sugerem que jovens estadunidenses com idades 15-24 anos adquirirão metade de todos as novas ISTs (SATTERWHITE et al., 2013) e que um em cada quatro adolescentes sexualmente ativas têm uma IST, como a clamídia ou papilomavírus humano (HPV) (FORHAN et al., 2009). Em 2014, foram notificados 948.102 casos de infecção por CT na população com 15-24 anos, representando 66% de todos os casos de clamídia relatados (Figura 2). Entre as mulheres entre 15-24 anos, a população-alvo para o rastreio da clamídia, a prevalência de infecção por CT foi de 3,3%. A taxa de casos de clamídia diminuiu 3,5% durante 2013-2014 nas mulheres de 15-19 anos, e aumentou 2,3% entre as mulheres de 20-24 anos. As maiores taxas de infecção por CT notificadas são de mulheres de 18-21 anos entre os anos de 2010 – 2014. Entre os homens, a prevalência na faixa de 15 – 24 anos de idade notificada foi de 1,1%. A Figura 3 ilustra a taxa de notificação de infecções por CT nos EUA conforme o sexo e faixa etária em 2014 (CDC, 2015).

Figura 2. Proporção das notificações de infecção por CT nos EUA em 2014, por faixa etária.



FONTE: adaptado de CDC, 2015.

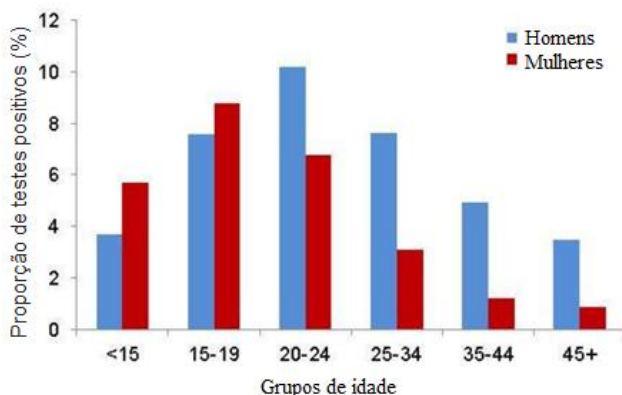
Figura 3. Taxas de notificação ao CDC (EUA) de casos de infecção por *Chlamydia trachomatis*, por sexo e faixa etária em 2014.



FONTE: adaptado de CDC, 2015.

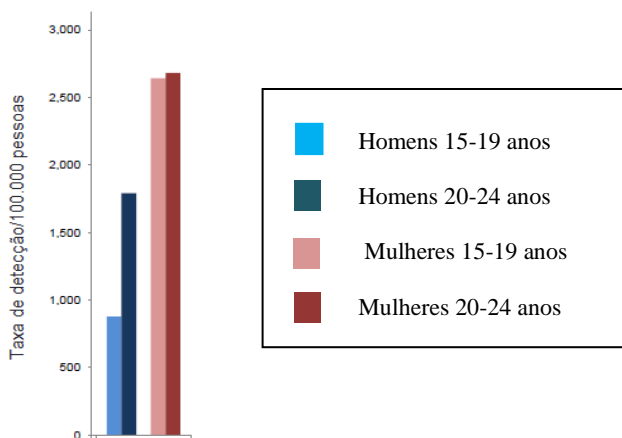
Na Inglaterra o governo criou um programa nacional de rastreio de clamídia – *National Chlamydia Screening Programm* – focado no rastreio da população jovem de 15 a 24 anos. O programa tem uma página na internet contendo muitas informações sobre a infecção por CT e sobre os locais que disponibilizam os testes diagnósticos, que são gratuitos. Em 2014, o programa de triagem teve a cobertura de diagnóstico para CT em 35% da população jovem feminina e 14% entre os homens (15-24 anos), e a prevalência média encontrada foi 8,3% na população alvo, sendo a maior entre o grupo feminino de 20-24 anos (Figura 4). Em 2013, o grupo com maior prevalência observada entre as mulheres foi entre as idades de 15-19 anos, e em geral, entre os homens de 20-24 anos (Figura 5) (UK, 2015).

Figura 4. Prevalência de *Chlamydia trachomatis* na população da Inglaterra em 2013, por gênero e grupo de idade. As maiores taxas são observadas entre as idades de 15 a 24 anos.



FONTE: adaptado de UK, 2015.

Figura 5. Detecção de *Chlamydia trachomatis* no ano de 2014 na Inglaterra, por gênero e grupo de idade, a cada 100.000 pessoas. A taxa de infecção por CT foi maior nas mulheres que nos homens em geral.



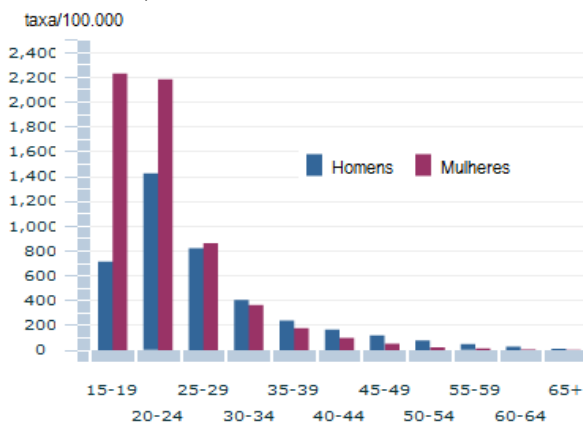
FONTE: adaptado de UK, 2005.

A infecção por CT passou a ser de notificação obrigatória em 1997 na Austrália, e as taxas de notificação têm aumentado constantemente na última década (NEWMAN et al., 2010). Porém,

estudos de prevalência mostram que a notificação é consideravelmente menor que o verdadeiro número de indivíduos com infecção por CT, devido à taxa de diagnóstico continuar baixa - 10% entre a população jovem. Dados do *Medicare* australiano indicam que essa proporção não é homogênea, pois cerca de 13% das mulheres jovens sexualmente ativas são testadas para CT por ano, em contrapartida, apenas 3-4% dos homens jovens são testados (KONG et al., 2011). A Figura 6 ilustra a taxa de infecção por CT de acordo com a idade e sexo, dados do programa de notificação do Governo Australiano.

O Ministério da Saúde do governo australiano financia um programa-teste de testes de clamídia, o ACCEPt - *Australian Chlamydia Control Effectiveness Pilot*. O objetivo é avaliar a viabilidade, aceitabilidade, eficácia e relação custo-eficácia dos rastreio de CT anuais nos indivíduos entre 16-29 anos. Este programa vai avaliar se o rastreio pode levar a uma redução na incidência de CT na população, auxiliando na tomada de decisões sobre a possibilidade de lançar um programa de rastreio clamídia nacional. O resultado final será disponibilizado no final do ano de 2016.

Figura 6. Notificações de infecção por *Chlamydia trachomatis* por idade e sexo, a cada 100.000 habitantes na Austrália em 2011.



FONTE: adaptado de AUSTRALIA, 2012.

Uma metanálise foi realizada para avaliar a prevalência da infecção por CT na Austrália, com artigos publicados entre 1997 – 2011 e que utilizaram técnica de NAAT para a detecção de CT. Foi

encontrada uma grande heterogeneidade entre os estudos, porém, a população jovem, os indígenas e pacientes de centros de saúde sexual tiveram as maiores taxas de infecção por CT. A prevalência entre mulheres com menos de 25 anos foi 5%, entre homens abaixo de 30 anos foi 4%. Nas populações pesquisadas em clínicas de planejamento família e de saúde sexual as taxas encontradas foram mais altas entre os homens, aproximadamente 10%, e 6% entre as mulheres (< 25 anos) (LEWIS et al., 2012). Um grande estudo conduzido em um hospital relatou a prevalência de 3,2% de CT em mulheres gestantes com menos de 25 anos (CHEN et al., 2009). A maior prevalência observada foi entre jovens mulheres de localidades indígenas, de 17 – 34 % (GOLLER et al., 2010).

A prevalência de CT encontrada por Conejero e colaboradores (2013) em uma população chilena de mulheres jovens que buscaram voluntariamente serviços de ginecologia foi de 8%. As amostras foram obtidas por autocoleta de conteúdo vaginal e avaliadas por NAAT. Na Itália, a infecção por CT foi detectada por PCR em 5,6% das 566 participantes (PANATTO et al., 2014).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) preconiza a abordagem sindrômica para o diagnóstico e tratamento das endocervicites, isto é, a definição da conduta é baseada na presença de fatores de risco para infecção por clamídia e em manifestações clínicas inespecíficas (BRASIL, 2006). A efetividade da abordagem sindrômica é questionável, uma vez que os sintomas geralmente são inespecíficos ou inexistentes (SILVA et al., 2009). Os dados de DST devem ser colhidos por meio da ficha do SINAN, sendo utilizados no nível municipal/local, para orientar as ações, entretanto a infecção por CT não é de notificação compulsória conforme a Portaria 1.984 de 12 de setembro de 2014, porém estados e municípios podem incluir ISTs na sua lista se acharem conveniente. O rastreio para CT é recomendado para gestantes de 15 a 24 anos realizado com testes de NAAT (BRASIL, 2014).

Um estudo multicêntrico nacional, realizado entre os anos de 2004 e 2005, analisou por captura híbrida amostras endocervicais de 3.303 gestantes (de qualquer idade) assistidas em serviços de atendimento pré-natal da atenção básica em seis cidades brasileiras (Manaus, Fortaleza, Goiânia, Rio de Janeiro, São Paulo e Porto Alegre) e encontrou uma prevalência global de 9,4% de infecção por CT (JALIL et al., 2008). Em 2009, outro estudo avaliou amostras de urina de 2.071 gestantes com idade entre 15 e 24 anos, realizado em hospitais públicos brasileiros, revelou uma prevalência semelhante, de 9,8%. Entretanto, a prevalência de CT variou significativamente entre as cinco regiões

brasileiras: a maior no Norte foi - 14,1% e a menor na região Sul – 6,9%, as demais regiões (Nordeste, Centroeste e Sudeste variaram de 8,6 – 11,3%) (PINTO et al., 2011).

Em Manaus, pesquisa conduzida em 2005 avaliou amostras endocervicais, por PCR, de 100 gestantes de baixo risco em um hospital universitário e encontrou 11% de prevalência da infecção por CT. Nesse trabalho também foram acompanhados os recém-nascidos das participantes e foi observado que as crianças expostas à infecção materna por CT têm 7,7 vezes mais chance de desenvolver sintomas respiratórios nos primeiros sessenta dias de vida (BORBOREMA-ALFAIA et al., 2005).

Em Curitiba, um estudo entre parturientes de baixo risco (entre 18 e 24 anos) de uma maternidade pública apresentou a prevalência de 6% de detecção de CT em urinas avaliadas por PCR. O fator de risco associando para a infecção por CT foi a baixa idade de sexarca (15,7 anos) (CARVALHO et al., 2010).

Garcês e colaboradores (2013) obtiveram 11% de prevalência de infecção por CT nas amostras endocervicais de gestantes de um ambulatório ginecológico hospitalar do Rio Grande do Sul, utilizando a PCR como metodologia laboratorial. Foi detectado nesse estudo que a escolaridade menor que oito anos, o início da atividade sexual antes dos 15 anos e ser portadora do vírus HIV foram os fatores de risco associados à infecção por CT.

Marconi e colaboradores (2012) observaram uma prevalência de 23,9% em 142 mulheres sintomáticas da cidade de São Paulo utilizando a PCR como metodologia. Machado e colaboradores (2012) obtiveram a maior prevalência de CT do país, 31% das amostras endocervicais de 100 adolescentes sexualmente ativas de 10 a 19 anos, na cidade de Salvador, foram detectadas CT por PCR. Um estudo estadual de Golfetto e colaboradores obtiveram a prevalência de 11,1% de CT em mulheres atendidas pelo SUS na cidade de São Miguel do Oeste (SC), com idades entre 14 e 79 anos.

3 METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

O presente trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina no dia 07/07/2014, sob o nº CAAE 32911514.1.0000.0121, parecer 711.390 (Anexo I).

3.2 Tipo, local e período do estudo

É um estudo quantitativo, descritivo e transversal. As amostras foram coletadas no período de julho de 2014 à outubro de 2015. As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias LBMM/CCS/DACL - Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC) na cidade de Florianópolis, Santa Catarina.

3.3 Coleta e processamento das amostras biológicas

A coleta de amostras para detecção de CT por PCR multiplex foi realizada com o *kit* UTMTM – RT (Copan - EUA), que contém um *swab* com haste adaptada para partição e um tubo contendo 3 mL de líquido conservante e específico para realização de PCR. A coleta do material endocervical ou vaginal foi feita com o *swab*, que depois ficou armazenado dentro do tubo com líquido conservante. A amostra foi armazenada em geladeira até a realização dos testes.

O estudo foi composto de duas etapas.

- A primeira etapa consistiu em um projeto teste para padronizar a metodologia de detecção do DNA de CT por reação em cadeia da polimerase multiplex (PCR multiplex) e a amostra de autocoleta vaginal. Nesta etapa, comparou-se os resultados da reação de Imunofluorescência Direta (IFD) com a PCR multiplex de material endocervical e comparou-se os resultados da PCR multiplex de amostra endocervical com a PCR multiplex do conteúdo vaginal obtido por autocoleta.

- A segunda etapa constitui-se no rastreio da infecção por CT com a metodologia padronizada no projeto teste, a fim de se determinar a prevalência de CT entre universitárias, de 18 a 30 anos, do campus Trindade da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.3.1 Projeto teste:

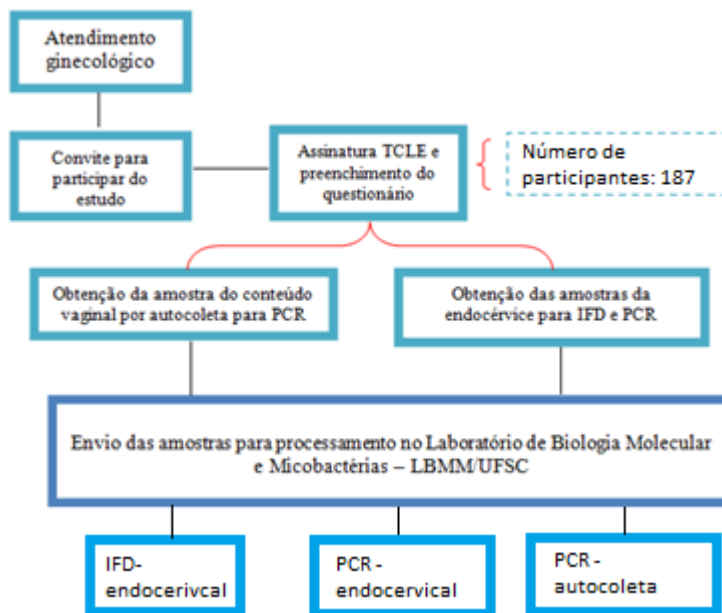
O grupo incluído nessa primeira etapa foi composto por mulheres que espontaneamente procuraram:

- o atendimento ginecológico e por gestantes que procuraram os serviços de emergência ginecológica no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC);
- um consultório ginecológico que faz atendimento com convênios e particular; e
- o Centro de Saúde do Itacorubi, da Rede de Atenção Básica de Atenção à Saúde da Prefeitura Municipal de Florianópolis.

Ao serem atendidas, as participantes foram informadas do estudo e convidadas a participar do estudo. As que concordaram em participar receberam todas as explicações sobre o estudo, e foi apresentado e explicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Apêndice I). Após da assinatura do TCLE, receberam a explicação para a realização da autocoleta de conteúdo vaginal (Apêndice III), e realizaram sua coleta com o *kit* UTMTM-RT (Copan – USA). Em seguida, durante o atendimento ginecológico, duas amostras endocervicais foram coletadas por profissional de saúde habilitado: uma para detecção de CT por IFD; e a outra para PCR multiplex. A Figura 7 ilustra o fluxograma da captação de amostras para o projeto teste.

Os resultados satisfatórios do projeto teste (padronização da PCR multiplex e comparação de resultados entre amostras pareadas endocervicais e vaginais) possibilitaram o início da segunda etapa do estudo, o rastreio entre as universitárias.

Figura 7. Fluxograma de captação de amostras para o projeto teste.



FONTE: A autora.

3.3.2 Rastreio para determinar a prevalência de CT entre as universitárias

O cálculo para definição do número de amostras incluídas neste estudo levou em consideração o número de mulheres em todos os cursos dos Centros de ensino do Campus Trindade/UFSC (Quadro 1). Para esse cálculo, considerou-se a população de 11.248 mulheres matriculada na UFSC em 2014, e estimou-se uma prevalência de 9% (de acordo com o estudo nacional), limite de confiança de mais ou menos 3%, com um intervalo de confiança de 95%, a amostragem calculada foi de 340 mulheres.

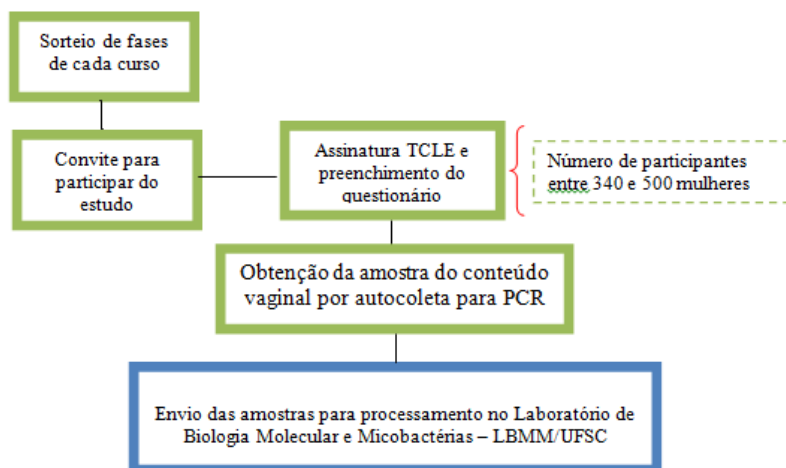
Foi sorteada uma fase de ensino de cada curso de graduação. Sorteada a fase, uma disciplina foi escolhida, dando-se preferência para aquelas em que não havia divisão de turma. A abordagem foi feita inicialmente com o(a) professor(a) que ministrava a disciplina, solicitando-lhe alguns minutos do final de sua aula para a exposição da

pesquisa para as alunas presentes. Após a exposição da pesquisa, as alunas que concordaram em participar do estudo, assinaram o TCLE e responderam ao questionário pré codificado e autoaplicável (Apêndice II). Então foram elucidadas as eventuais dúvidas e entregue o *kit* UTMTM -RT (Copan - USA) para a participante realizar a autocoleta de conteúdo vaginal.

Cada amostra e questionário das participantes foram identificados com número sequencial para manter sua identidade em sigilo. Os resultados foram utilizados somente nesta pesquisa. As variáveis estudadas foram: dados clínicos: dor no ato sexual, corrimento vaginal, diagnóstico anterior de infecções genitais ou de infecções sexualmente transmissíveis (ISTs), manutenção dos sintomas mesmo após tratamento de outra infecção, histórico de preventivo (colpocitologia oncótica) alterado; comportamentais: quantidade de parcerias sexuais ao longo da vida e atualmente, uso de preservativo em todas as práticas sexuais, idade de início da atividade sexual, tabagismo, ingestão alcoólica (classificada como: abstinência, moderada, excessiva ou adicta).

A Figura 8 ilustra o fluxograma da captação de amostras para o rastreio de CT nas universitárias.

Figura 8. Fluxograma de captação de amostras para o rastreio da prevalência de CT.



FONTE: A autora.

Quadro 1: Relação dos Centros de ensino e seus respectivos cursos do Campus Trindade/UFSC.

Centro	Cursos	Centro	Cursos
Ciências Biológicas (CCB)	Ciências Biológicas	Filosofia e Ciências Humanas (CFH)	Antropologia
Ciências da Educação (CED)	Arquivologia		Ciências Sociais
	Biblioteconomia		Filosofia
	Educação do Campo		Geografia
	Pedagogia		Geologia
Ciências da Saúde (CCS)	Enfermagem		História
	Farmácia		Museologia
	Fonoaudiologia		Oceanografia
	Medicina		Povo indígenas SMA
	Nutrição		Psicologia
	Odontologia	Sócio-Econômico (CSE)	Administração
Ciências Físicas e Matemáticas (CFM)	Física		Ciências Contábeis
	Matemática		Ciências Econômicas
	Meteorologia		Relações Internacionais
	Química		Serviço Social
Ciências Jurídicas (CCJ)	Direito	Tecnológico (CTC)	Arquitetura e Urbanismo
Comunicação e Expressão (CCE)	Artes Cênicas		Ciências da Computação
	Design		Engenharia Civil
	Jornalismo		Engenharia de Alimentos
	Letras- Libras		Engenharia de Controle e Automação
	Letras- L. portuguesa		Engenharia de Materiais
	Letras- L. estrangeiras		Engenharia de Produção
Desportos (CDS)	Educação Física		Engenharia Elétrica
			Engenharia Eletrônica
			Engenharia Mecânica
			Engenharia Química
			Engenharia Sanitária e Ambiental
			Sistemas de Informação

Fonte: adaptado de www.ufsc.br

3.4 Testes laboratoriais

3.4.1 Pesquisa de CT por Imunofluorescência Direta (IFD)

A IFD que no momento do estudo teste era a metodologia utilizada no HU/UFSC foi realizada com o *kit* Fluorotec® (Omega Diagnostics - Alemanha) no qual o conjugado é constituído de

anticorpos monoclonais marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) são direcionados especificamente para proteínas de membrana externa, comuns a todos os sorotipos de clamídia. Nesta metodologia o raspado endocervical foi a amostra exigida. No laboratório, o esfregaço foi fixado com metanol. Em seguida adicionou-se 25 µL do conjugado e a lâmina foi incubada em câmara úmida em estufa a 35°C por 30 minutos. Após incubação, foi feita uma lavagem para remover o conjugado não ligado. A leitura da reação foi realizada em microscópio de fluorescência com sistema de filtro para FITC (comprimento de onda de excitação máxima de 490 nm, comprimento médio de emissão de 530 nm) em objetiva de aumento de 100 vezes. Em decorrência da conjugação do FITC aos anticorpos monoclonais anti-CT, nesta reação os corpos elementares ou reticulares extracelulares exibem uma fluorescência “verde maçã”, que contrasta com o fundo marrom avermelhado (células epiteliais ou colunares e leucócitos). Segundo as orientações do fabricante, o teste foi considerado positivo quando mais de 10 corpos de CT foram observados. A reação foi negativa quando se encontrou menos de 10 corpos de CT. A amostra foi considerada imprópria para o teste quando foram encontradas menos de 10 células colunares (intactas ou rompidas). Se as lâminas de controle negativo e/ou positivo não apresentaram os resultados esperados os testes eram inválidos.

3.4.2 PCR multiplex para detecção de CT

3.4.2.1 Extração do DNA da CT

Todos os materiais utilizados nos testes moleculares foram livres de DNase e RNase e todos os reagentes tinham grau de biologia molecular.

Antes da extração do DNA, a amostra foi concentrada em cinco vezes por centrifugação. Para a extração do DNA foi utilizado o QIAamp DNA Mini *Kit*® (Qiagen - Alemanha) conforme as instruções do fabricante: de cada amostra conservada na solução UTMTM - RT transferiu-se 200µL para um microtubo de 1,5mL contendo 20µL de proteinase K. A mistura foi incubada a 56°C por 10 minutos. Após a incubação, fez-se um spin nos microtubos para garantir que toda a amostra fosse depositada. Adicionou-se 200µL de etanol (96 – 100%) e homogenizou-se em vórtex por 15 segundos, e repetiu-se o spin. Essa

solução foi aplicada em uma coluna QIAmp Mini e centrifugada a 5.000 xg. Transferiu-se a coluna para um microtubo de 2mL e descartou-se o microtubo contendo o filtrado. Adicionou-se à coluna 500µL do tampão AW1. Centrifugou-se a 5.000 xg. Transferiu-se a coluna para um microtubo de 2mL e descartou-se o microtubo contendo o filtrado. Adicionou-se à coluna 500µL do tampão AW2 e centrifugou-se a 15.400 xg. Transferiu-se a coluna para um microtubo de 1,5mL e descartou-se o microtubo contendo o filtrado. Adicionou-se 50µL do tampão AE e incubou-se por 5 minutos. Ao passo final, centrifugou-se a 5.000 xg. Os DNAs foram armazenados a temperatura de -20°C até a sua utilização. O restante das amostras conservadas na solução UTMTM - RT foi armazenado a -80°C para novas extrações.

3.4.2.2 Amplificação do DNA de CT por PCR multiplex

A partir do DNA genômico extraído, foi amplificado por PCR um segmento de 201 pares de base (pb) da ORF de número 4 do plasmídeo críptico de CT utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) CTP1/CTP2 (CTP1-5' TAGTAACTGCCACTTCATCA 3' e CTP2 5' TTCCCCTGTGAATTCGTTGC 3') (GRIFFAIS; THIBON, 1989).

O segundo alvo incluído na PCR foi o gene da betaglobina humana para a amplificação de um segmento de 101 pb, como controle interno da reação e para avaliar a presença de inibidores e a qualidade da amostra. O resultado de cada amostra só foi validado com a presença da banda de betaglobina, indicando que houve quantidade celular satisfatória na amostra extraída. O segmento do gene da betaglobina foi amplificado utilizando-se os *primers* PCO3/PCO4 (PCO3 5' -ACACAACTGTGTTCACTAG - 3' PCO4 5' -CAATTCATCCACGTTACC - 3') (SAIKI et al., 1988).

Diversas condições de amplificação e concentração de reagente foram testadas: de MgCl₂ (2,0; 2,25; 2,50 e 2,75 mM); dos *primers* CTP1 e CTP2 (0,25; 0,4; 0,5 e 0,75 mM), nas temperaturas de pareamento de 55 °C e 57 °C (Figuras 9, 10 e 11, em Resultados). De todas essas condições, a reação com melhor amplificação e sem bandas inespecíficas, para as amostras endocervicais e vaginais está descrita a seguir.

A reação foi PCR multiplex padronizada foi realizada em um volume final de 25µL contendo 2,5mM de MgCl₂; 0,5µM de

CTP1/CTP2; 0,4 μ M de PCO3/PCO4 e 5 μ L do DNA molde. A reação de amplificação foi realizada em termociclador Mastercycle Personal® (Eppendorf - Alemanha) ou termociclador GeneAmp (Applied Biosystems - USA) com as seguintes condições: desnaturação inicial 94°C/10 minutos; desnaturação: 94°C/40 segundos; pareamento: 57°C/40 segundos; extensão: 72°C/40 segundos em 40 ciclos; e um ciclo de extensão final: 72°C/10 minutos. Em cada reação, foi utilizado como controle positivo de CT uma solução do plasmídeo críptico e um controle negativo no qual não havia presença de qualquer DNA. Os *amplicons* foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 2,5% a 80V/40 minutos, corados pelo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta em ImagenQuant LAS500 (GE- EUA). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação ao padrão de tamanho de DNA (DNA ladder 100pb Invitrogen™ Life Technologies- EUA).

O controle positivo de CT utilizado na PCR foi o plasmídeo críptico de CT clonado com a sequência do plasmídeo críptico da CT (PLGV 440), gentilmente cedido por Golfetto e colaboradores (2014).

3.4.3 PCR em tempo real para CT (qPCR)

A qPCR foi realizada com o *kit* comercial *Chlamydia* Q-PCR Alert® (Amplimaster, Amplimix, Ampliprobe e Standart, Nanogen - Itália) registrado na ANVISA. Esse ensaio permite a detecção qualitativa e quantitativa do DNA do plasmídeo críptico de CT e do gene constitutivo de betaglobina humana para fins de diagnóstico clínico da infecção por CT. O detector de fluorescência para o DNA de CT é o FAM™ (fluoresceína), e o de betaglobina, o VIC®. A mistura Amplimix foi composta de oligonucleotídeos, base Tris, Tris hidrocloreto, glicerol e Triton X-100.

A reação foi preparada conforme as instruções do fabricante, com volume final de 25 μ L: adicionou-se 100 μ L do Amplimix no tubo Amplimaster, em seguida, adicionou-se 100 μ L do Ampliprobe no tubo Amplimaster. Essa solução foi passada em vórtex por 5 segundos e depois centrifugada por 5 segundos. Dispensou-se 20 μ L da solução em cada poço da microplaca e então 5 μ L do DNA extraído das amostras. No poço do controle negativo foi adicionado 5 μ L de água estéril livre de nucleasse, do controle negativo 5 μ L do DNA de plasmídeo críptico de CT. A curva de DNA padrão com as concentrações 102, 103, 104, 105 cópias de DNA foi aplicada em duplicata, 5 μ L em cada poço.

A reação de amplificação foi realizada em um Sistema PCR Tempo Real (Fast Real-Time PCR System), HT 7900 (Applied Biosystems - EUA) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB/CCB/UFSC), com as seguintes condições: 50°C/2 minutos (descontaminação); 95°C/10 minutos (desnaturação inicial); e extensão 95°C/15 segundos, 60°C/1 minuto por 45 ciclos. O resultado foi analisado com o software SDS v2.4 (Applied Biosystems - EUA).

A análise quantitativa dos resultados é realizada com a curva padrão calculada de acordo com os valores das quantificações dos ciclos (Ct - threshold cycle) da amplificação das quatro concentrações de DNA. A curva foi validada quando o valor do coeficiente de correlação (R2) esteve entre 0,990 e 1,000.

Segundo o fabricante, a sensibilidade analítica desse teste é de dezesseis a um milhão de cópias alvo de DNA por reação. O limite de detecção é de sete cópias de DNA alvo. O ensaio é eficiente para detecção de todos os sorovares de CT por ter com alvo uma região bem conservada do plasmídeo críptico. A especificidade do ensaio é maior que 98,25% e a sensibilidade de amostras positivas é de 92,5%.

Foram selecionadas para o teste por qPCR 78 amostras (endocervicais e vaginais, positivas e negativas) para a comparação com a PCR multiplex.

3.5 Metodologia de Análise de dados

As análises dos resultados foram realizadas no Software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), versão 17.0®.

A acurácia das metodologia foi avaliada por duas maneiras: 1) a acurácia calculada pela soma dos VPP e VPN divididos pelo total de avaliações entre os testes (tabela 2x2); 2) determinada pela razão de probabilidade negativa (RP) - ou razão de verossimilhança ("*likelihood ratios*"). RP negativa = 1 – sensibilidade/ especificidade, sendo RP negativa: < 0.1 (acurácia ótima); 0.1-0.2 (acurácia moderada); 0.2-0.5 (acurácia pequena); 0.5-1.0 (acurácia nula).

Os indicadores de qualidade avaliados para IFD (amostras endocervicais) avaliados foram: sensibilidade, especificidade, VPP, VPN, acurácia e RP negativa em relação à PCR multiplex. Estes mesmos indicadores de qualidade foram avaliados para a PCR multiplex de CT em amostras de conteúdo vaginal em dois momentos:

1º) Com amostras do projeto teste, os resultados das amostras de conteúdo vaginal foram comparados com os de seus respectivos pares

de amostras endocervicais (padrão-ouro) quando avaliadas por PCR multiplex;

2º) Na padronização da PCR multiplex, os indicadores de qualidade foram avaliados separando-se os resultados das análises das amostras endocervicais e das vaginais, sendo o padrão-ouro a qPCR.

A sensibilidade de detecção da quantidade de DNA de CT da PCR multiplex foi avaliada por uma curva de concentrações conhecidas de plasmídeo críptico da CT.

A determinação da concordância entre os métodos PCR multiplex foi avaliada pelo teste Kappa, utilizando-se a qPCR como padrão-ouro e adotaram-se como referência os valores determinados por Altman (1991). Desta forma, foi atribuída concordância pobre para valores de Kappa entre 0,00-0,20, concordância razoável a valores entre 0,21 a 0,40, concordância moderada a valores entre 0,41-0,60, concordância boa a valores 0,61-0,80 e excelente concordância a valores entre 0,81-1,00.

As variáveis nominais: múltiplos parceiros, uso de preservativo constante, antecedente de infecções vaginais ou IST sintomáticas, presença de corrimento vaginal e dor no ato sexual, uso de cigarro, resultado de exame preventivo alterado anteriormente foram expressas por meio de porcentagem. A associação entre as variáveis nominais e os desfechos positividade para CT foi realizada pelo teste Exato de Fisher em um nível de significância de 95%. Para verificar a correlação entre as variáveis nominais e os desfechos foi utilizada a Análise de Regressão Logística Binária.

A verificação da normalidade das variáveis contínuas ou ordinais foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. A frequência das variáveis contínuas ou ordinais não paramétricas foi expressa em mediana, moda, valores máximos e mínimos e relacionados com a detecção de CT pelo teste Mann-Whitney. A correlação de Pearson foi utilizada para avaliar a correlação entre variáveis ordinais não paramétricas.

4. RESULTADOS

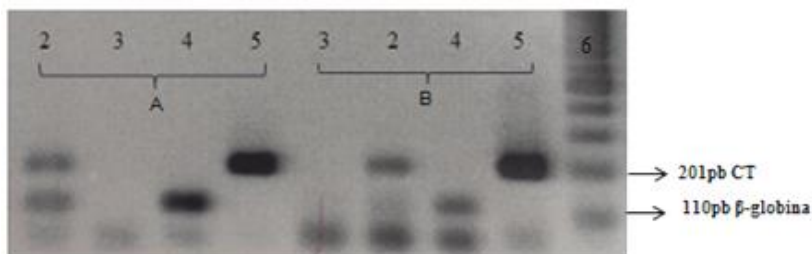
4.1 PADRONIZAÇÃO DA PCR multiplex

A padronização da PCR multiplex com melhor estringência está apresentada na Figura 9A e contém $[MgCl_2]=2,50 \text{ mM}$; $[CTP1]$ e $[CTP2]=0,5 \text{ mM}$ em temperatura de 57°C .

As Figuras 9B, 10 e 11 apresentam os resultados das outras condições/concentrações de reagentes testadas que não apresentaram bons resultados. As concentrações testadas dos reagentes $MgCl_2$ (2,0; 2,25; 2,50 e 2,75 mM); dos *primers* CTP1 e CTP2 (0,25; 0,4; 0,5 e 0,75 mM), em diferentes temperaturas de pareamento dos *primers* – 55°C e 57°C .

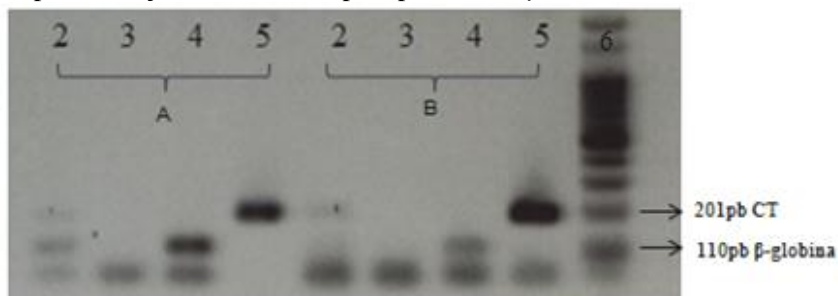
A Figura 12 ilustra a curva de sensibilidade da PCR multiplex para CT realizada com concentrações conhecidas de clones do plasmídeo críptico clonado, que amplificou um fragmento de 201pb.

Figura 9. Gel representativo das bandas de interesse nos testes para padronização da PCR multiplex para *Chlamydia trachomatis*.



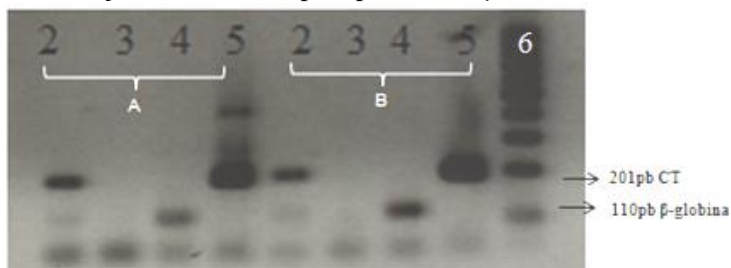
PCR com temperatura de pareamento 57°C . A= $[MgCl_2]$ 2,50 mM; $[CTP1]$ e $[CTP2]$ 0,5 mM. B= $[MgCl_2]$ 2,75mM; $[CTP1]$ e $[CTP2]$ 0,5 mM. 2: Amostra clínica positiva para CT e beta globina. 3: Controle negativo. 4: Controle positivo de beta globina humana. 5: Controle positivo de CT. 6: Padrão de tamanho de DNA (DNA ladder 100pb Invitrogen™ Life Technologies).

Figura 10. Gel representativo das bandas de interesse nos testes para padronização da PCR multiplex para *Chlamydia trachomatis*.



PCR com temperatura de pareamento 55°C. A= [MgCl₂] 2,50 mM; [CTP1] e [CTP2] 0,5 mM. B= [MgCl₂] 2,75mM; [CTP1] e [CTP2] 0,5 mM. 2: Amostra clínica positiva para CT e beta globina. 3: Controle negativo. 4: Controle positivo de beta globina humana. 5: Controle positivo de CT. 6: Padrão de tamanho de DNA (DNA ladder 100pb Invitrogen™ Life Technologies).

Figura 11. Gel representativo das bandas de interesse nos testes para padronização da PCR multiplex para *Chlamydia trachomatis*.



PCR com temperatura de pareamento 57°C e [MgCl₂] 2,50 mM. A= [CTP1] e [CTP2] 0,25mM. B= [CTP1] e [CTP2] 0,40 mM. 2: Amostra clínica positiva para CT e beta globina. 3: Controle negativo. 4: Controle positivo de beta globina humana. 5: Controle positivo de CT. 6: Padrão de tamanho de DNA (DNA ladder 100pb Invitrogen™ Life Technologies).

Figura 12. Gel representativo dos produtos da PCR para avaliação da sensibilidade de detecção do DNA do plasmídeo críptico de *Chlamydia trachomatis*.



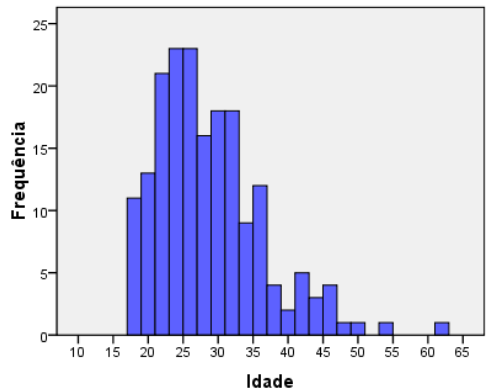
Canaleta 1: 2,19 ng/μL ng /μL; canaleta 2: 1,09; canaleta 3: 0,55 ng/μL; canaleta 4: 0,27 ng/μL; canaleta 5: 140 pg/μL; canaleta 6: 70 pg/μL; canaleta 7: 35 pg/μL; ng/μL canaleta 8: 17,5 pg/μL; canaleta 9: controle negativo; canaleta 10: DNA ladder 50pb Invitrogen™ Life Technologies

4.1.1 Amostragem no projeto teste

A coleta tríade (duas amostras endocervicais e uma de autocoleta de conteúdo vagina) foi realizada em 105 participantes. Durante a realização do projeto teste foi descontinuado o fornecimento do *kit* para IFD. A partir de julho de 2015 o projeto teste continuou apenas com as amostras pareadas endocervicais e de conteúdo vaginal para PCR. Estas coletas pareadas foram realizadas em 128 participantes.

O número total de participantes do projeto teste foi de 187, com mediana de 27 anos de idade (Figura 13).

Figura 13. Frequência absoluta das idades das participantes incluídas no projeto teste.



4.1.2. Acurácia da Imunofluorescência Direta para CT

A IFD foi positiva para apenas duas das 11 amostras endocervicais positivas para PCR multiplex (2/11), apresentando sensibilidade de 18%, especificidade e VPP 100%, VPN 93%, acurácia 93% e RP negativa 0,82 (acurácia nula) (Tabela 1). Esses dados mostram a baixa eficiência diagnóstica da IFD, motivo suficiente para a retirada do seu uso na prática clínica.

Tabela 1. Avaliação das amostras endocervicais incluídas no projeto teste.

		PCR multiplex		Total
		POSITIVA	NEGATIVA	
		N (%)	N (%)	
IFD	POSITIVA	2 (1,6%)	0 (0,0%)	2 (1,6%)
	NEGATIVA	9 (7,0%)	117 (93,0%)	126 (98,4%)
Total		11 (8,6%)	117 (91,4%)	128 (100%)

4.1.3 Avaliação das amostras vaginais no projeto teste

No projeto teste, a amostra vaginal e a endocervical coletadas da mesma participante foram avaliadas por PCR multiplex, sendo os resultados da amostra endocervical o padrão-ouro. Das 128 amostras pareadas, 15 foram positivas na amostra endocervical e 14 positivas na amostra vaginal (14/15) (Tabela 2).

Os índices de qualidade das amostras vaginais em relação às amostras pareadas endocervicais avaliadas por PCR multiplex foram: sensibilidade 93%, especificidade 100%, VPP 100%, VPN em 99%, acurácia 99% e RP negativa 0,07 (acurácia ótima).

Tabela 2. Avaliação das amostras endocervicais e vaginais pareadas por PCR multiplex no projeto teste.

Pares de amostras		PCR multiplex endocervical		Total
		POSITIVA	NEGATIVA	
PCR multiplex vaginal	POSITIVA	14 (10,90%)	0 (0,0%)	14 (10,90%)
	NEGATIVA	1 (0,8%)	113 (88,3%)	114 (89,10%)
Total		15 (11,7%)	113 (88,3%)	128 (100%)

As amostras incluídas no estudo foram avaliadas nos testes moleculares quanto à sua qualidade de coleta. Uma amostra endocervical que foi positiva na PCR multiplex não apresentou nenhuma célula na lâmina de IFD, considerada amostra insuficiente e foi excluída da análise entre as três metodologias. Todas as amostras avaliadas na qPCR também apresentaram amplificação da betaglobina pelo detector VIC.

4.1.4 Acurácia da PCR multiplex

4.1.4.1 Curva padrão

A qPCR foi realizada com uma curva padrão de quantidade de DNA (102, 103, 104, 105 cópias) e o Coeficiente de correlação (R2) obtido na curva que relaciona a quantificação dos ciclos (Ct - *threshold cycle*) com a quantidade de DNA foi 0,999 (aceitável: de 0,990 a 1,000), validando a amplificação. Os valores de Ct obtidos da amplificação do DNA da curva padrão estão apresentados na Tabela 3 e o gráfico com os valores de Ct estão ilustrados nas Figuras 14 e 15.

Tabela 3. Curva padrão de DNA de CT e os valores respectivos de Ct obtidos na qPCR.

CURVA PADRÃO DE DNA CT			
Número de cópias de DNA	Ct (replicata)		Média dos Cts
10 ²	30,7	30,3	30,5
10 ³	26,8	26,8	26,8
10 ⁴	23,54	23,54	23,54
10 ⁵	20,26	20,24	20,25

Figura 14. Gráfico da amplificação da curva padrão de DNA de CT em replicata com os valores obtidos de Ct na qPCR.

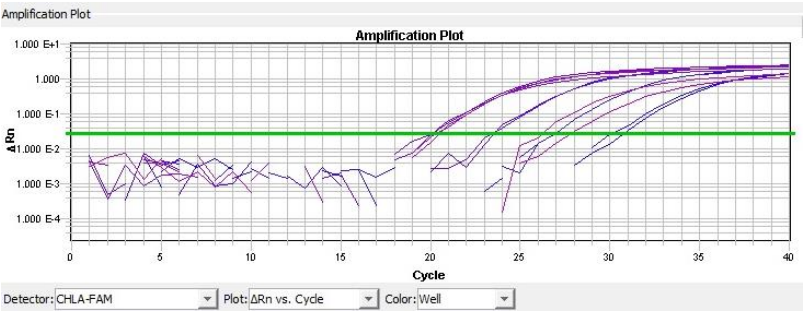
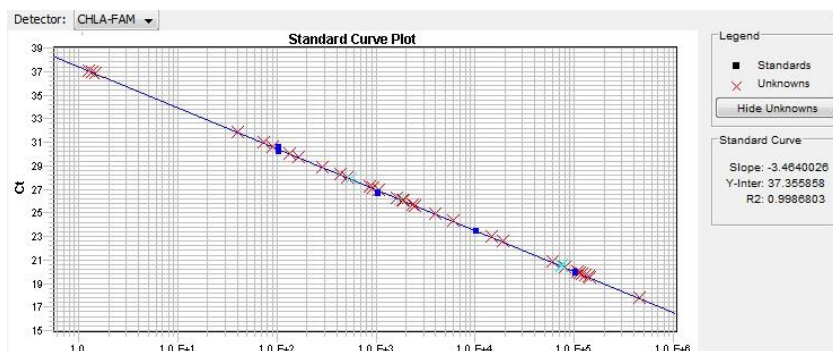


Figura 15. Gráfico da reta obtida pela curva padrão, com as quantidades de DNA e os Cts correspondentes da curva padrão e de cada amostra testada na reta obtida pela curva padrão.

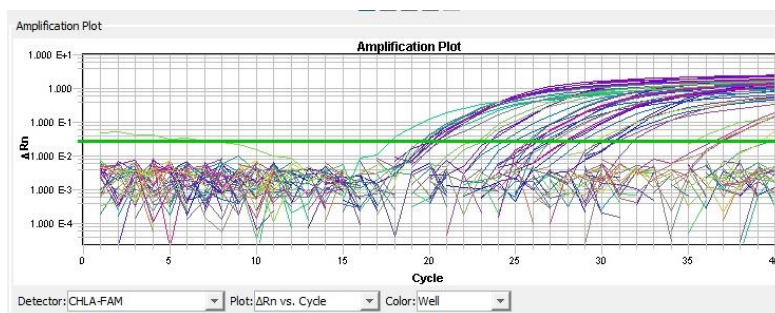


4.1.4.2 Análise das amostras por qPCR

Para a determinação da acurácia da PCR multiplex foram comparados os resultados de 78 amostras analisadas pela qPCR e pela PCR multiplex. O quantitativo foi dividido em: 13 amostras endocervicais positivas e 14 negativas; 15 positivas amostras vaginais e 36 negativas.

Todas as amostras endocervicais obtiveram resultado concordante na qPCR e na PCR multiplex (28/28). Três amostras de autocoleta vaginal foram positivas na qPCR, mas não na PCR multiplex (12/15). Os Ct dos ciclos de amplificação dessas três amostras vaginais foram 36,7; 36,7 e 36,5 (Figuras 15 e 16); e correspondem a 15 cópias de DNA molde.

Figura 16. Gráfico evolução dos ciclos da qPCR das amostras avaliadas.



As diferenças dos resultados na detecção de CT entre a qPCR e a PCR multiplex foram encontradas nas amostras de autocoleta vaginal, por isso, os indicadores da PCR multiplex foram calculados separadamente entre amostras vaginais e endocervicais em relação à qPCR (padrão-ouro) (Tabela 4).

A Tabela 5 exhibe a comparação dos indicadores de qualidade obtidos entre PCR multiplex das amostras vaginais e seu par de amostra endocervical (como ilustrado na Tabela 2) com os valores obtidos na qPCR e na PCR multiplex das amostras vaginais.

As amostras de autocoleta vaginal avaliadas na PCR multiplex tiveram sensibilidade de 83% considerando-se a qPCR como padrão-ouro, especificidade 100% e VPP 100%, VPN 92%, acurácia 94% e RP negativa 0,17 (acurácia moderada).

As concordâncias entre os testes de qPCR e PCR multiplex dos dois tipos de coleta de amostra avaliadas separadamente (vaginal e endocervical) foram excelentes: a PCR multiplex das endocervicais obteve Kappa= 1,000 ($p < 0,01$) e a PCR multiplex das amostras vaginais, Kappa= 0,832 ($p < 0,01$) considerando-se a qPCR como padrão-ouro.

Tabela 4. Comparação do resultado das mesmas amostras vaginais avaliadas por qPCR e PCR multiplex.

		qPCR		Total	Kappa
		POSITIVA	NEGATIVA		
PCR multiplex de amostras vaginais	POSITIVA	15 (29,4%)	0 (0,0%)	15 (29,4%)	0,832 e p=0,000
	NEGATIVA	3 (5,9%)	33 (64,7%)	36 (70,6%)	
Total		18 (35,3%)	33 (64,7%)	51 (100%)	

Tabela 5. Comparação dos índices de qualidade dos resultados das amostras vaginais por qPCR e por PCR multiplex (IC 95%).

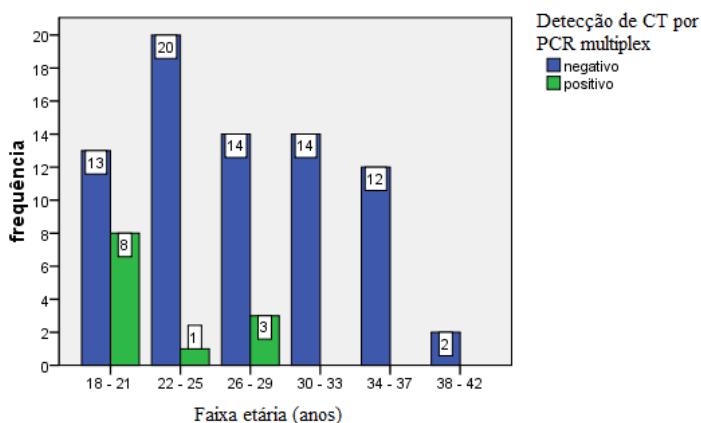
		Mesma amostra de autocoleta avaliada por qPCR*	Par endocervical por PCR multiplex *
PCR multiplex autocoleta vaginal	Sensibilidade	83%	93%
	Especificidade	100%	100%
	Acurácia	94%	99%
	VPP	100%	100%
	VPN	92%	99%
	RP negativa	0,17	0,07

*teste considerado o padrão-ouro.

4.1.5 Prevalência de CT entre as gestantes atendidas nos serviços de emergência do HU/UFSC

Dentre as participantes do estudo teste, 88 foram gestantes atendidas na Emergência Obstétrica ou no Centro Obstétrico do HU/UFSC, com idade mediana de 26 anos. A prevalência de CT encontrada foi 13,6% neste grupo, sendo 75% das amostras positivas em mulheres de 18 a 25 anos de idade. A mediana das idades entre as amostras positivas foi de 20 anos e entre as amostras negativas, 27 anos (Figura 17).

Figura 17. Frequências de idade por faixa etária e detecção de CT entre as gestantes incluídas no projeto teste.

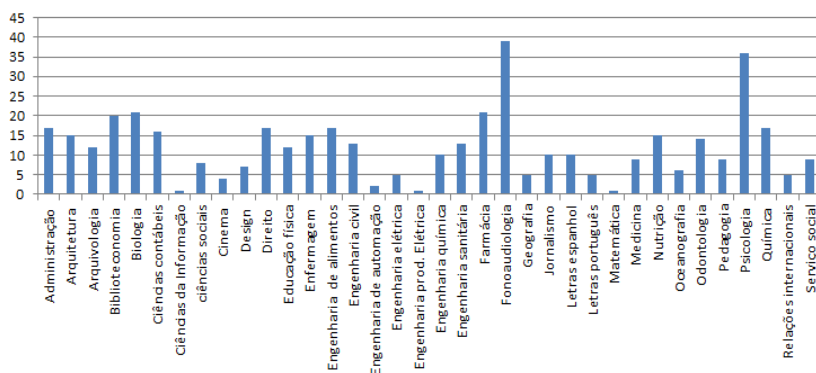


4.2 Resultados do estudo da Prevalência entre as Estudantes da UFSC

Foram coletadas amostras, dados clínicos e comportamentais (questionários) de 435 alunas matriculadas nos cursos oferecidos pela Universidade Federal de Santa Catarina no *Campus* Trindade/Florianópolis. Essas alunas representam 36 cursos de graduação, com representatividade de todos os centros de ensino do Campus. A Figura 18 apresenta os cursos incluídos no estudo e o número de amostras coletadas em cada um. A prevalência de CT avaliada por autocoleta de conteúdo vaginal encontrada foi de 3% (13/435).

Quatro amostras coletadas não apresentaram a amplificação da betaglobina humana, invalidando o teste da amostra e não foram contadas na amostragem. Dentre as participantes, 2,3% (10) já apresentaram exame com resultado positivo para CT anteriormente e nenhuma foi positiva na autocoleta vaginal seguida de PCR multiplex.

Figura 18. Frequência absoluta de universitárias participantes do rastreio de CT por curso de graduação (N= 435).



Conforme apresentado na metodologia, após a seleção dos cursos houve sorteio da fase que seria incluída no estudo. A Tabela 6 apresenta a frequência e a porcentagem de cada fase no quantitativo amostral do estudo.

Tabela 6. Frequência de universitárias participantes do rastreio de CT por fase do curso de graduação

fase										
do	primeira	segunda	terceira	quarta	quinta	sexta	sétima	oitava	nona	décima
curso										
N	25	33	51	39	93	63	61	49	16	5
%	25,0	7,6	11,7	9,0	21,4	14,5	14,0	11,3	3,7	1,1

A moda das idades das participantes foi 20 anos, a mediana foi 21 anos em um intervalo de 18 a 30 anos (Figura 19), e entre as positivas para CT a idade mais comum foi 20 anos com quatro casos (31%). A faixa de 20-21 anos foi a de maior número de detecção de CT, seguida da 22-23 anos. As duas faixas etárias juntas englobam 85% (11) das amostras positivas (Figura 20).

Figura 19. Frequência absoluta das idades das universitárias participantes do rastreio de CT (N= 435).

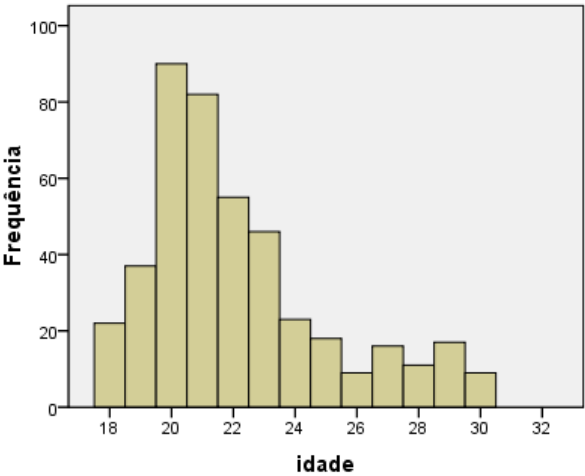
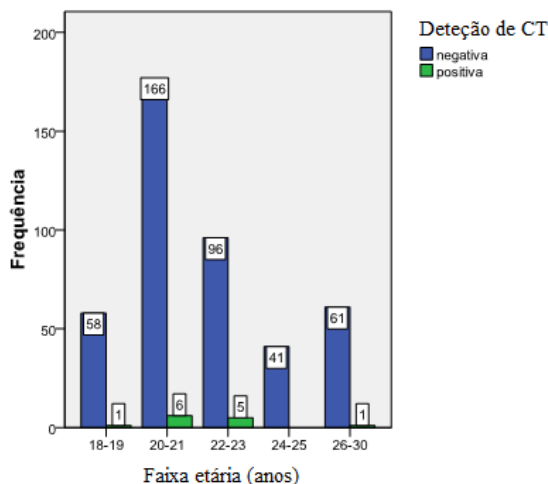


Figura 20. Frequência absoluta da detecção de CT por faixa etária entre as universitárias participantes do rastreio de CT.

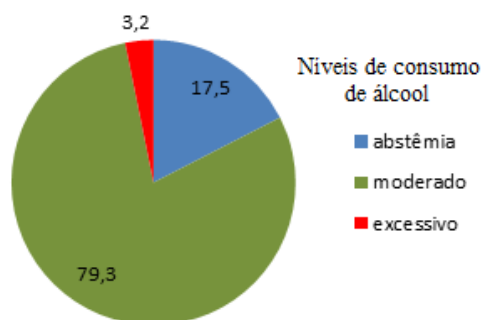


Entre as características comportamentais obtidas por questionário autoaplicável, o consumo de álcool foi muito comum. Apenas 17,5% são abstêmias do consumo de álcool, entretanto existe o consumo excessivo de álcool em 3,2% (14) da população estudada (Figura 21). O consumo de álcool “social” ficou incluído na mesma categoria do consumo moderado. O “beber social” ou beber responsavelmente não necessariamente é um grau de consumo inferior ao moderado (uso recreativo), visto que em festas é comum o uso até chegar a intoxicações (BRASIL, 2006). O uso de tabaco foi relatado por 4,1% (18) das jovens. Não houve diferença estatística da prevalência da CT entre as populações fumantes e não fumantes ($p=0,427$ – teste Exato de Fischer) e nem entre os diferentes níveis de ingestão alcoólica ($p=0,954$ – teste de Mann-Whitney U) (Tabela 7).

Tabela 7. Frequência do uso de tabaco e do consumo de álcool entre as universitárias participantes do rastreio de CT.

		Detecção de CT			p
		Negativa	Positiva	Total	
		N (%)	N (%)	N (%)	
Uso de tabaco	não	405 (93,1%)	12 (2,8%)	417 (95,9%)	0,427
	sim	17 (3,9%)	1 (0,2%)	18 (4,1%)	
	Total	422 (97,0%)	13 (13,0%)	435 (100,0%)	
Consumo de álcool	abstêmio	74 (17,0%)	2 (0,5%)	76 (17,5%)	0,954
	moderado	334 (76,8%)	11 (2,5%)	345 (79,3%)	
	excessivo	14 (3,2%)	0	14 (3,2%)	
	Total	422 (97,0%)	13 (3,0%)	435 (100,0%)	

Figura 21. Gráfico da frequência (relativa - %) dos níveis de consumo de álcool entre as universitárias participantes do rastreio de CT.



Infecções vaginais prévias por outros microrganismos infecciosos vaginais foram relatadas por 40% das mulheres e a candidíase foi a infecção mais comum (31%), seguida do HPV (7%) (Figura 22). Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a ocorrência de infecções prévias ($p=0,350$). Para a avaliação da relação do HPV com a frequência de CT, foram consideradas as respostas positivas para infecção prévia por HPV e as positivas para resultado de exame preventivo prévio alterado, e não houve associação estatisticamente significativa ($p=0,907$) (Tabela 8).

Figura 22. Gráfico das frequências absolutas das infecções vaginais por outros microrganismos.

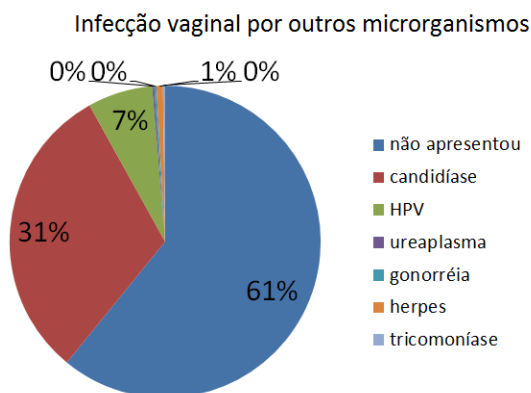


Tabela 8. Relação entre infecção vaginal por outros microrganismos e exame preventivo prévio alterado com a detecção de CT entre as universitárias participantes do rastreio.

		Detecção de CT		Total	p*
		Negativa N (%)	Positiva N (%)	N (%)	
Infecção vaginal prévia	não	252 (58%)	9 (2%)	261 (60%)	0,350
	sim	170 (39%)	4 (1%)	174 (40%)	
	Total	422 (97%)	13 (3%)	435 (100%)	
	não respondeu	1 (0,2%)	0	1 (0,2%)	
Exame preventivo alterado	não	360 (82,75%)	11 (2,5%)	371 (85,3%)	0,907
	sim	61 (14,0%)	2 (0,5%)	63 (14,5%)	
	Total	422 (97%)	13 (3%)	435 (100%)	

p* calculado pelo teste Exato de Fisher.

O uso constante de preservativo foi relatado por 27% (120) das participantes, entretanto, três dessas foram positivas para CT. A presença de corrimento vaginal foi relatada por 52% (227) e de dor durante o ato sexual por 20% (85). Não foi encontrada associação estatisticamente significativa da prevalência de CT com nenhuma das três variáveis ($p=0,497$; $p=0,091$ e $p=0,236$ respectivamente). A Tabela 9 exibe os dados de frequência referentes a presença de corrimento vaginal e o uso de preservativo constante entre as universitárias participantes do rastreio de CT.

Tabela 9. Presença de corrimento vaginal e o uso de preservativos em relação à detecção de CT.

		Detecção de CT		Total	p
		negativa	positiva		
Presença de corrimento vaginal	não	205 (47,1%)	3 (0,7%)	208 (47,8%)	0,091
	sim	217 (49,9%)	10 (2,3%)	227 (52,2)	
	Total	422 (97,0%)	13 (3,0%)	435(100%)	
Uso constante de preservativo	não	305 (70,1%)	10 (2,3%)	315 (72,4%)	0,497
	sim	117 (26,2%)	3 (0,7%)	120 (27,6%)	
	Total	422 (97,0%)	13 (3,0%)	435 (100%)	

Quase metade das participantes (47,4%) relataram ter no máximo duas parcerias sexuais ao longo da vida (Figura 23). Foi encontrada relação estatisticamente significativa entre o número de parcerias sexuais e a frequência de CT, quanto maior o número de parcerias, maior a prevalência de CT ($p=0,010$). Entre as amostras negativas para CT, 48% (203) tiveram uma ou duas parcerias sexuais ao longo da vida, com mediana de três parcerias e a moda de uma parceria; enquanto que no grupo das positivas, 61% (8) tiveram cinco ou mais parcerias, a mediana e a moda foram mais de cinco parcerias (Figura 24). Mulheres com cinco ou mais parcerias tiveram 76,5% mais chance de ter infecção por CT comparando-se com uma ou duas parcerias sexuais (*odds ratio* Exp (B)= 0,235; $p= 0,035$; IC 95% 0,061 – 0,901). Entre as participantes deste estudo, 3,4% afirmaram estar com mais de um parceiro no momento da pesquisa, mas não foi encontrada associação significativa com a prevalência da CT (Exato de Fisher: $p= 0,367$).

Figura 23. Gráfico das frequências (%) do número total de parcerias sexuais ao longo da vida, entre as universitárias participantes do rastreio de CT.

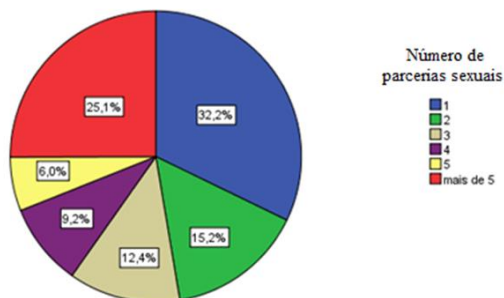
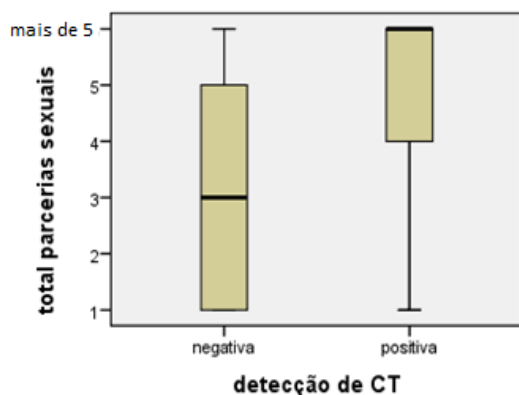


Figura 24. Frequência do número total de parcerias sexuais por detecção de CT entre as universitárias participantes do rastreio de CT.



$p = 0,010$, calculado por teste de Man-Whitney U.

A idade do início da atividade sexual variou de 12 a 24 anos (Figura 25) com mediana de 17 anos tanto para o grupo negativo quanto para o positivo para CT, e não havendo diferença estatística significativa em relação à prevalência de CT ($p = 0,968$) (Figura 26). Há correlação entre a idade atual das mulheres e a idade de início da atividade sexual

($p=0,004$), sendo que quanto mais jovem foi a participante, mais cedo teve início sua atividade sexual, embora seja uma fraca correlação (correlação de Spierman 0,138).

Figura 25. Idades de início da atividade sexual entre as universitárias participantes do rastreio de CT, por frequência absoluta.

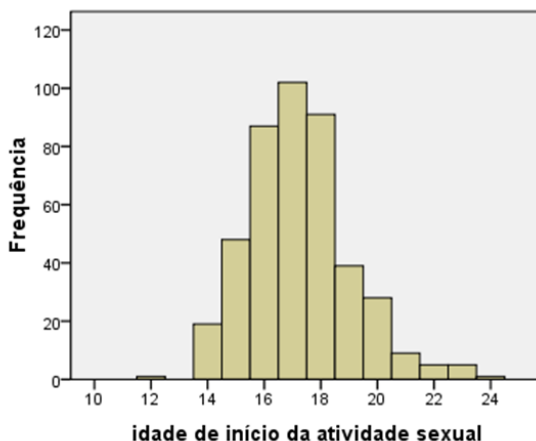
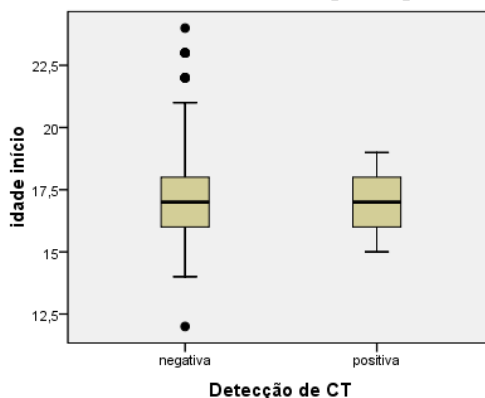


Figura 26. Frequência da idade de início da atividade sexual por detecção de CT entre as universitárias participantes do rastreio de CT.



$p = 0,968$, calculado pelo teste de Man-Whitney U.

5. DISCUSSÃO

A infecção por CT tem importância mundial, devido a elevada prevalência em população sexualmente ativa. No Brasil, estudos de prevalência têm sido voltados a populações de maior risco como gestantes (JALIL et al., 2008; PINTO et al., 2011). São poucos os estudos em populações assintomáticas, como por exemplo, jovens universitárias.

A autocoleta de material vaginal é bem aceita pelas mulheres e pela comunidade clínica para o rastreio de CT (DOSHI et al., 2008; HOCKING et al., 2013; HUANG et al., 2011; PAPP et al., 2014; SCHACHTER et al., 2005)

A participação das universitárias no presente estudo foi maior que a esperada. Em média 70% das alunas convidadas aceitaram participar da pesquisa. A menor participação se dava quando havia pouco tempo para o final da aula e elas não poderiam esperar a explicação da pesquisa. Em contrapartida, a adesão das alunas após a explanação sobre a pesquisa era frequentemente alta. A coleta de conteúdo vaginal feita com o *kit* foi considerada de fácil execução pela maioria das participantes e nenhuma foi incapaz de fazê-la. Estudos publicados sobre o assunto relatam alta adesão ao *kit* de autocoleta com *swabs* vaginais (DOSHI et al., 2008; GRASECK et al., 2010; HOCKING et al., 2013; HUANG et al., 2011; JENKINS et al., 2011; PAPP et al., 2014; SCHACHTER et al., 2005), e também por populações leigas. Tingey e colaboradores (2015) relataram alta aceitabilidade entre mulheres de 18 e 19 anos de uma comunidade indígena: 69 % preferiram o rastreio por autocoleta que feito em clínica, 75% incentivariam amigas para usar este método e 100% repetiriam a autocoleta.

Metodologias sofisticadas de detecção de CT estão disponíveis, como *kits* comerciais de NAATs automatizados ou semi- automatizados. No entanto, em países de baixa renda, o custo inicial de introduzir NAATs comerciais pode ser proibitivo (WHILEY et al., 2006). Portanto, há necessidade urgente da padronização de testes de diagnóstico com custos acessíveis que permitam a criação de programas de rastreio e o monitoramento da infecção. A PCR *in house*, se bem padronizada e controlada, é um método tão eficiente como outros métodos comerciais e é mais acessível para os países de baixa renda (AGUILERA-ARREOLA, et al., 2014).

A padronização da PCR multiplex foi obtida com sucesso e o método é apropriado para detecção de CT em amostras de autocoleta

vaginal. As recomendações mais atuais do CDC são da utilização de um método NAAT em amostras de *swab* vaginal para mulheres e urina para homens (CDC, 2014).

A vantagem da utilização de um gene constitutivo como alvo (betaglobina humana) em uma PCR multiplex é a possibilidade de avaliação, amostra por amostra, da presença de inibidores da PCR, pois quando presentes não permitem a amplificação do alvo. Ao mesmo tempo, possibilita a análise da qualidade da amostra coletada e, no caso de amostra obtida por autocoleta, permite também que se certifique que a amostra foi realmente coletada, uma vez que mesmo nas amostras negativas é obrigatória a amplificação desse gene que está presente em todas as células humana. Somente as amostras com amplificação do gene da betaglobina foram avaliadas quanto a detecção de CT no presente estudo. Amostras incorretas, bem como a contaminação entre as amostras durante a análise podem ser esperadas também em amostras de autocoleta vaginal (STEWART et al., 2007).

A amostragem do projeto teste foi estendida para mais de 100 participantes para melhorar a avaliação da qualidade da coleta vaginal e da detecção por PCR multiplex neste tipo de amostra, pois quanto maior o número de amostras endocervicais positivas pudesse ser pareado com as de conteúdo vaginal, mais confiáveis seriam os resultados do teste padronizado neste estudo.

Durante as coletas do projeto teste, ficou evidente a baixa sensibilidade da IFD em relação à PCR multiplex, conforme já bem estabelecido na literatura internacional (FRIAS et al., 2001; LAND, et al., 2009; MEDEIROS, et al., 2007; SEADI, et al., 2002). Por motivos de falta de fornecimento dos testes diagnósticos, a IFD deixou de ser realizada no SACL/HU/UFSC. Neste momento por razões financeiras, a DACL optou por utilizar na rotina hospitalar a PCR multiplex padronizada neste estudo, por considerar que os critérios de qualidade adotados (controle interno da reação e controle positivo clonado) atendiam os dispositivos da RDC 302/ANVISA/2005 para testes *in house*. A literatura propõe a sensibilidade de IFD de 80-85% em relação à cultura celular, porém a sensibilidade da cultura celular em relação à PCR é de 70% (FRIAS et al., 2001; LAND, et al., 2009; MEDEIROS, et al., 2007; SEADI, et al., 2002; OSSERWAARDE et al., 1992). Neste estudo a sensibilidade encontrada foi muito aquém (18%) da relatada na literatura, provavelmente por influência da qualidade da amostra coletada. A positividade da IFD depende de amostra exclusivamente endocervical; a coleta de material endocervical para a realização de outros exames ginecológicos pode diminuir a quantidade de amostra em

coletas múltiplas, por isso, nesses casos, se a lâmina para IFD for uma das últimas a ser preparada, contribuirá para emissão de resultados falso-negativos, ou ainda, se a carga bacteriana for muito baixa o método pode não ser capaz de detectar a bactéria.

No presente estudo, as acurácias dos testes IFD e PCR multiplex foram avaliadas por diferentes indicadores para melhor compreensão da acurácia dos métodos. A acurácia é proporção total de resultados corretos de um teste diagnóstico e reflete a precisão desse teste para detecção de determinada doença ou infecção em comparação ao padrão-ouro. A razão de probabilidade (RP) negativa relaciona os resultados de sensibilidade e especificidade de um método. Pode ser explicado como a probabilidade de um resultado negativo de um teste fosse o esperado em um paciente não portador da doença, comparado com a probabilidade de que o mesmo resultado fosse o esperado em um paciente com a doença. Quanto melhor o teste, mais perto de zero fica seu valor. A RP relaciona a sensibilidade com a especificidade. A argumentação de acurácia baseada em VPP e VPN não é ideal, visto que estes indicadores não avaliam uma propriedade intrínseca do método, pois depende da prevalência da doença. Se a probabilidade de doença for muito baixa, os métodos apresentam bom VPN e se a probabilidade de doença for muito alta, os métodos apresentam bom VPP.

O índice de concordância kappa é uma medida entre observadores e mede o grau de concordância entre resultados, além do que seria esperado tão somente pelo acaso, e varia geralmente de 0-1; quanto mais próximo de 1, maior a confiabilidade, valores próximos ou menores que zero sugerem que a concordância é atribuível ao acaso.

Embora tenham sido observados bons resultados dos indicadores de qualidade da IFD para especificidade (100%), VPP (100%) e VPN (93%) e acurácia (93%), a RP negativa foi nula, pois apresentou um valor de RP negativa próximo de 1,0 (0,82) devido a sensibilidade muito baixa (18% em relação à PCR multiplex), indicando que o resultado negativo da IFD não muda a chance de identificar a presença de infecção em relação a não realização do teste.

Os valores de sensibilidade, especificidade, VPN, acurácia e a RP negativa de amostra vaginal comparadas com seu par endocervical (93%; 99%; 99%; e 0,07 respectivamente) durante o projeto teste definiram a possibilidade da realização do rastreio de CT na população universitária por autocoleta vaginal seguida de amplificação do DNA de CT pela PCR multiplex padronizada neste estudo.

Na padronização da PCR multiplex para amostra vaginal, os indicadores de qualidade foram avaliados separadamente pelo tipo de

amostra (endocervical e vaginal) para dar ênfase aos resultados dos testes para as amostras de autocoleta vaginal. A acurácia da PCR multiplex de amostras vaginais foi 94%, porém foi considerada moderada pela RP negativa (0,17). A sensibilidade da PCR multiplex das amostras de autocoleta vaginal foi 83% em relação à qPCR (padrão-ouro). Na comparação dos resultados pareados (vaginal e endocervical) durante o projeto teste, a sensibilidade da PCR multiplex de amostras vaginais foi de 93% (adotando a PCR multiplex endocervical como padrão-ouro). Embora apresentou menor sensibilidade em relação à qPCR, o método ainda é considerado muito sensível.

Diversos estudos relataram sensibilidades comparáveis as de raspado endocervical – de 90% a 98% e especificidade entre 96% e 99% (HOCKING et al., 2013; NOVAIS, ALVES, 2004; XIA et al., 2007). Estudos compararam a detecção de CT quatro testes de NAATs de segunda geração em amostras de *swab* vaginal por autocoleta urinária (primeiro jato) de 575 mulheres. A prevalência encontrada foi de 9% e as amostras de conteúdo vaginal indicaram mais infecções do que as urinárias em todos os ensaios, com sensibilidades dos testes de 84,6 - 98,1% contra 75,5 - 88,7% nas amostras urinárias, que podem conter inibidores de amplificação. As diferenças de sensibilidade analítica e níveis de alvos moleculares podem explicar as diferenças de sensibilidades nos testes utilizados em amostras clínicas (CHERNESKY et al., 2006; CHERNESKY et al., 2014; GAYDOS et al., 2003; SCHACHTER et al., 2005; VAN DER POL et al., 2013).

O VPN da PCR multiplex de amostras endocervicais foi melhor que das vaginais (99% e 92% respectivamente) na comparação com a qPCR, porque três amostras vaginais anteriormente consideradas negativas na PCR multiplex foram positivas na qPCR. Essas amostras tiveram valores de Ct de 36,5; 36,7 e 36,7; bem mais altos que a média dos Cts das demais amostras vaginais positivas (25,5 - [19 a 31,7]), que significa que a amplificação visível do DNA nestas amostras ocorreu após maior número de ciclos de expansão. A quantidade de DNA calculado para o Ct 36,7 é de 15 cópias de DNA, muito próximo ao limite de detecção (7 cópias de DNA). Apesar da PCR multiplex apresentar menor sensibilidade que a qPCR, o custo-benefício justifica dessa técnica justifica sua escolha para o cenário clínico local. Um *kit* de qPCR comercial custa em torno de 4,5 vezes mais que a PCR multiplex para o mesmo número de amostras avaliadas.

Embora o estudo tivesse apenas o objetivo de validar a metodologia, observou-se a formação de um grupo homogêneo de 88 gestantes que procuraram o serviço de emergência obstétrico do

HU/UFSC. A prevalência neste grupo foi de 13,6%, sendo 75% das amostras positivas em mulheres de 18 a 25 anos. A maioria das gestantes foram pacientes de risco, que chegaram ao hospital com ruptura prematura de membrana (bolsa rota), constituindo-se em grupo de risco também para IST entre elas CT. A prevalência encontrada no presente estudo é maior que a encontrada em estudos brasileiros, visto que os estudos brasileiros avaliaram gestantes de baixo risco (9,4 – 11%) (BORBOREMA-ALFAIA et al., 2005; GARCÊS et al., 2013; CARVALHO et al., 2010; JALIL et al., 2008).

Medir a verdadeira prevalência de CT em uma população específica é uma tarefa desafiadora. Um fator que limita as comparações das prevalências de CT entre os estudos publicados é o elevado nível de heterogeneidade dentro e entre as populações estudadas (LEWIS et al., 2012). Estudos utilizando dados de base populacional sobre a prevalência de clamídia são mundialmente raros (VAJDIC et al., 2005; CDC, 2015). Os estudos de base comunitária podem ser particularmente suscetíveis a vieses de prevalência conforme a amostragem (grupos sintomáticos e de alto risco) e por baixas taxas de participação (KONG et al., 2011; LEWIS, 2012; MACLEOD et al., 2005). Entretanto, os estudos de base comunitária são importantes para estimar a prevalência de CT, pois as taxas de notificação subestimam os níveis de infecção por serem altamente influenciados pelo número de pessoas testadas. Lewis e colaboradores (2012) realizaram uma revisão sistemática para avaliar a prevalência de CT na população australiana e só encontram um estudo de base populacional (VAJDIC et al., 2005) que relatou a prevalência de 3, 1% de CT entre as mulheres de 18 a 24 anos de idade em 2003-2004, destacaram, também, que os dados de notificação subestimavam consideravelmente o verdadeiro número de indivíduos infectados. Nos EUA, muitos casos de clamídia não são diagnosticados e, por isso, não notificados, assim o relatório anual de vigilância utiliza apenas uma fração da verdadeira carga de infecções sexualmente transmissíveis no sistema de saúde daquele país. No entanto, ele fornece dados importantes sobre o alcance, distribuição e tendências em diagnósticos de IST (CDC, 2015).

O rastreio de CT entre as universitárias foi realizado com 435 participantes de 18 a 30 anos, com mediana de 21 anos de idade. A prevalência de CT em amostras vaginais entre as universitárias foi 3%, e a moda das idades de amostras positivas foi 20 anos. No presente estudo a faixa etária de 20 a 23 anos engloba 85% das amostras positivas para CT em acordo com as publicações mundiais sobre o tema. As faixas etárias de 15-19 e 20-25 anos são as mais prevalentes nas publicações

mundiais (AHRQ, 2007; AUSTRALIA, 2011; CDC, 2015; CHRISTIAN et al., 2005; KAMWENDO et al., 1996; LAN et al., 2008; NCSSG, 2006; SCHOLES et al., 1996; TILSON et al., 2002; 2008; UK, 2015). Por motivos operacionais, só foram incluídas neste estudo mulheres com 18 anos ou mais.

Diversos fatores de risco são apontados em relação à infecção por CT como idade inferior a 26 anos, baixo nível socioeconômico, relações sexuais sem uso de preservativo, o uso de contraceptivos orais, idade da primeira relação sexual, novos ou múltiplos parceiros sexuais, falta de conhecimento sobre IST (MARQUES et al., 2007; VRANIC, 2012; WHO, 2005). Garcês e colaboradores (2013) relataram que o tempo de escolaridade menor que oito anos foi um fator de risco para CT. As variáveis para nível socioeconômico não foram abordadas no presente estudo porque foi desenhado com a população universitária, o nível de escolaridade já é superior ao encontrado como fator de risco. Esse pode ser o principal fator para a baixa prevalência encontrada na população estuda com relação às publicações com a mesma faixa etária.

O número de parcerias sexuais ao longo da vida foi um fator de risco significativo associado à prevalência de CT. Mulheres com cinco ou mais parcerias corresponderam a 61% das amostras positivas, elas apresentaram 76,5% mais chance de ter infecção por CT comparando-se com as mulheres que relataram ter uma ou duas parcerias sexuais. Entretanto, uma única parceria sexual pode ser suficiente para se infectar por CT, no presente estudo, em uma amostra positiva foi relatada parceria única. Neste estudo destaca-se o fato de que quase a metade das participantes relatou uma ou duas parcerias e que a frequência de cinco ou mais parcerias foi mais comum que as frequências somadas de três e quatro.

O uso de preservativo em todas as práticas sexuais foi relatado somente por 27% das participantes, porém cabe ressaltar que três participantes que relataram o uso constante do preservativo foram positivas para CT (23% das positivas). Diversas participantes questionaram o termo “práticas sexuais” e este pode não ter sido bem entendido por todas elas. É possível que o termo tenha sido entendido somente por relação sexual de penetração vaginal, excluindo outras fontes de contaminação por CT.

Dados nacionais de comportamento sexual foram obtidos pela pesquisa "Conhecimentos, Atitudes e Práticas na População Brasileira" (PCAP), em 2008, com 2.485 jovens. A iniciação sexual com menos de 15 anos ocorreu em 17% das mulheres, e cerca de 15% dos indivíduos dessa faixa etária relataram ter tido mais de cinco parcerias sexuais no

último ano. Entre os jovens (15 a 24 anos de idade) que tiveram antecedentes relacionados a ISTs, 78,8% das mulheres procuraram tratamento na última vez que tiveram sintomas, principalmente as de classe social A/B e de áreas urbanas. Apenas 35% relataram o uso regular de preservativos, dados que demonstram a vulnerabilidade da população às ISTs. As maiores proporções de mulheres sexualmente ativas que fizeram exame preventivo foram encontradas entre aquelas pertencentes às classes A/B (82,1%) (BRASIL, 2011).

A fase do curso de graduação apresentou relação estatística com a frequência de CT ($p=0,04$). Entre as negativas a mediana foi a quinta fase, e entre as positivas, a sétima. Foi avaliado também que há correlação entre o a fase do curso e o número de parcerias sexuais ($p=0,006$), porém essa correlação é fraca (0,133), pois quanto mais próximo de zero mais fraca é a correlação de Spearman. Portanto, o número de parcerias sexuais pode ser julgado mais importante que a fase do curso de graduação em que se encontra a estudante.

A idade do início da atividade sexual não foi diferente entre os grupos positivos e negativos para CT (mediana dos dois grupos foi 17 anos). Pinto e colaboradores (2011) relataram que 33% das gestantes incluídas no estudo tiveram a primeira relação sexual antes dos 15 anos, com 1,5 vezes mais chance de ter infecção por CT que mulheres que tiveram o início da vida sexual após os 15 anos de idade.

Foi encontrada fraca relação significativa (correlação de Spierman 0,138) entre a idade da participante e a idade do início da atividade sexual. Quanto mais jovem foi a participante, menor a idade de início da atividade sexual, e quanto mais velha a participante, mais tarde foi o início da atividade sexual. Essa relação demonstra a possibilidade de haver alguma diferença comportamental e cultural entre os jovens ao passar de alguns anos. Essa variável é um fator de risco relatado em estudos, provavelmente porque quanto mais cedo for o início da atividade sexual, maior a chance de ter mais parcerias sexuais, e esse sim foi um fator de risco encontrado no presente estudo. Conforme este raciocínio, quanto maior o número de parcerias, maior a probabilidade de encontrar um patógeno sexualmente transmissível por meio do aumento da chance de escolher um parceiro portador da CT (VRANIC, 2012).

Além disso, a ectopia cervical aumenta a suscetibilidade a infecções e é muito comum em mulheres adolescentes e jovens (BRABIN et al., 2005; TILSON et al., 2004).

A frequência do uso de tabaco foi baixa (4,2%), entretanto a maioria das participantes consome álcool (81,5%), algumas de maneira

excessiva (3,2%), quando a intenção é se embriagar e pode desenvolver dependência. Muitas participantes questionaram a ausência de uma opção “beber socialmente” e a opção mais condizente a ser assinalada pela participante que se autoavaliava nessa faixa de consumo era a moderada. O “beber socialmente” como uma opção não foi adotado pelos pesquisadores, pois mesmo que o consumo seja uma vez por semana, se for abusivo ou tóxico não é considerado “beber socialmente” que remete ao “beber consciente” (BRASIL, 2006).

A infecção vaginal prévia por outros microrganismos foi comum em 40% das participantes e a mais comum foi a candidíase. Esses dados foram relatados pelas próprias participantes conforme elas lembravam, porém algumas alunas relataram não saber se haviam tido, pois relataram não olhar os exames laboratoriais que o médico pede e nem saber qual a função da medicação quando receitado.

A infecção prévia por HPV foi relatado por 7% das pacientes e sua relação com a variável “preventivo alterado” às vezes não foi congruente. Para as análises estatísticas realizadas no presente estudo, o número considerado de preventivo alterado anteriormente foi somado com a quantidade assinalada de HPV (quando a participante assinalou somente uma das duas variáveis no questionário). Um estudo conduzido em Santa Catarina encontrou 20,5% de HPV de alto risco em mulheres com menos de 24 anos de idade que procuraram os serviços de saúde para fazer colpocitologia oncótica de rotina, e somente 15% das amostras positivas apresentaram alteração no exame de colpocitologia oncótica. Os autores não encontraram associação entre variáveis comportamentais estudadas com os desfechos positividade de para CT e positividade para a coinfeção HPV/CT. Para a associação entre HPV e CT, mulheres com amostras positivas para CT apresentaram 2,4 vezes mais chances de ter HPV do que mulheres com amostras negativas (GOLFETTO et al., 2014). Embora a infecção por HPV não tenha se mostrado significativa como fator de risco para infecção por CT no presente estudo, é importante salientar sua alta prevalência e sua importância como agente etiológico para o desenvolvimento do câncer cervical (BARROS, 2007; WALLIN et al., 2002; PANATTO et al., 2014).

A variável presença de corrimento vaginal não foi significativa relacionada à prevalência de CT ($p=0,091$), porém há uma tendência em ser mais comum o aparecimento de corrimento em participantes CT positivas. Entre as participantes positivas para CT, 77% apresentaram corrimento vaginal, e entre as CT negativas, 51%. É possível que em uma amostragem com maior frequência de CT esta variável seja

significativa, mas ainda sim não é esperado que alguma variável de sintomas de CT seja significativa, justamente por ser uma infecção assintomática na maioria das vezes ou com sintomas inespecíficos (PEIPERT, 2003; STAM, 2007).

A frequência de alunas que não atendiam ao critério de inclusão – sexualmente ativa - para o presente estudo foi maior que a esperada, e aumentava quanto menor a fase do curso sorteada. A participação no estudo de alunas que ainda não iniciaram atividade sexual foi solicitada por algumas delas pelo motivo do receio de ter sido infectada por CT ao usar banheiros públicos, mas elas receberam orientações e não foram incluídas no estudo.

No início da explicação do estudo na sala de aula, a pesquisadora perguntava se elas sabiam o que era clamídia ou se já tinham ouvido falar sobre essa bactéria, e em torno de 10-15% respondeu sim. Menor ainda foi a taxa de alunas que já tinha sido submetida a algum exame para CT ou que sabia se esse exame tinha sido solicitado pelo médico. Mas 2,3% (10) das participantes relataram que já tiveram exame positivo para CT anteriormente e em nenhuma dessas foi detectado CT na amostra avaliada neste estudo. Nesse grupo com diagnóstico anterior de CT, 70% relataram ter tido mais de quatro parcerias sexuais.

As dúvidas mais comuns das alunas envolviam as formas de transmissão da bactéria e se a infecção também ocorre em homens. A pesquisadora foi questionada por algumas alunas por que os homens não estavam sendo rastreados. Elas manifestaram a preocupação de que ficaria um estigma que as ISTs são transmitidas somente por mulheres. Outras dúvidas referentes à saúde da mulher, questões íntimas de sexualidade, exames de preventivo e tratamentos foram questionadas a pesquisadora durante a coleta de amostras. Exemplos de questionamentos comuns entre as estudantes: “Essa bactéria está relacionada ao câncer, como o HPV?”; “Posso me contaminar ao usar um vaso sanitário público?”; “Sendo uma bactéria tão comum e silenciosa, por que não foi pedido o exame pelo médico?”; “Se não pretendo ter filhos, preciso fazer o teste?”. Para a pesquisadora, ficou o sentimento de falta de informação sobre a saúde no aspecto sexual ou íntimo das alunas abordadas e que provavelmente reflete o conhecimento entre as estudantes da universidade. Hipoteticamente pode-se pensar que há falta de diálogo com os profissionais de saúde por não se sentirem à vontade para fazer os questionamentos ou falta de tempo durante o atendimento clínico.

Segunda a pesquisa brasileira PCAPE (2008), o menor percentual de conhecimento correto de formas de transmissão do HIV foi entre

jovens de 15 a 24 anos (51,7) e os o maior (62%) foi com idade entre 25 e 34 anos. Entre indivíduos com ensino primário incompleto, 27% concordavam que podem ser infectados pelo HIV em banheiros públicos, e a proporção entre os indivíduos de maior escolaridade foi de 13% (BRASIL, 2011).

A experiência de algumas alunas que integraram o presente estudo e que participaram de intercâmbios como o Programa Ciências sem Fronteiras, na Irlanda e Inglaterra, foi muito interessante para a pesquisadora, pois ouviu relatos de que é muito divulgada a campanha de rastreio de CT, a informação está em quase todos os banheiros públicos em forma de cartazes, e os *kits* de autocoleta vaginal estão à disposição nas universidades.

São necessários esforços de intervenção pública que afetem o comportamento de risco sexual dos jovens, assim como aspectos subjacentes das condições sociais e culturais (SIEVING et al., 2012; UPCHURCHU et al., 2004). Além disso, na elaboração de programas de IST, devem se considerar as necessidades dos adolescentes e jovens, incluindo horário estendido nos postos de saúde, otimizar a privacidade nas salas de espera, e tentar melhorar as técnicas de detecção de CT em urina diagnóstico (TILSON, 2004).

Observa-se que países que adotaram o rastreio de CT como rotina, entre mulheres jovens sexualmente ativas, obtiveram resultados satisfatórios de custo-efetividade, mesmo quando as prevalências da infecção são baixas (FERNÁNDEZ-BENÍTEZ et al., 2013; HONEY et al., 2002; NCSSG 2006; AHRQ, 2007).

O presente estudo avaliou a detecção de CT em conteúdo vaginal, mas um estudo alemão propõe que infecções por CT podem não ser diagnosticadas somente com a coleta vaginal. Os autores pesquisaram a coinfeção cervicovaginal e anorretal por CT através da autocoleta com *swabs* em 654 participantes (idade média de 23 anos). Foi verificada uma prevalência de 11% de infecção cervicovaginal e 8% anorretal, e 68% dos casos positivos foram encontrados em ambas os sítios anatômicos. A taxa de infecções detectadas apenas no *swab* retal foi de 4%. A recomendação dos autores é que mais estudos sejam realizados a fim de identificar as complicações da infecção anorretal (VAN LIERE et al., 2014). Outros autores corroboram sobre a perda de diagnósticos de infecção por CT extraurogenital, chegando a taxa de 14% de infecções falso-negativas por CT se somente amostras genitais/urinárias fossem testadas (BAZAN et al., 2015; TREBACH et al., 2015).

Uma limitação do presente estudo foi o emprego de questionário autoaplicável, no qual informações importantes podem ser omitidas

pelas participantes pelo receio de quebra de sigilo, podendo interferir diretamente nos resultados. Outra limitação foi a falta do questionamento sobre o uso de antibióticos nos meses anteriores a pesquisa, e esse fator seria importante critério de exclusão para uma pesquisa de prevalência de CT. Se considerarmos a hipótese a população universitária pode ter mais acesso a atendimento médico e medicamentos como os antibióticos, a prevalência por CT obtida no presente estudo pode ser um pouco menor que a real.

Os novos avanços na tecnologia da informação, incluindo melhorias no software de registros médicos, o desenvolvimento de software de extração de dados (ST LIAW, 2010) e interligação dos dados (MAK, WATKINS, 2008; ZHAO et al., 2013), irá facilitar a análise de dados sócio-demográficos, comportamentais e clínicos padronizados e detalhados (incluindo a presença ou ausência de sintomas relacionados à infecção por clamídia) de postos sentinela. Isso permitirá que as tendências sejam avaliadas ao longo do tempo em diferentes grupos

Zhao e colaboradores (2013) projetaram um aplicativo informatizado que oferece recomendações simples para ajudar a otimizar os resultados médicos com os programas de prevenção e controle de CT. Para melhorar a eficiência do uso de recursos clínicos limitados, modelos matemáticos de alocação dos recursos foram desenvolvidos para calcular uma solução ótima em relação às seleções de grupos de pacientes, ensaios de rastreio, e regimes de tratamento (HEIJNE et al., 2010; ATTERWHITE et al., 2008; TAO et al., 2012). Os parâmetros utilizados nestes modelos normalmente vêm a partir de dados publicados (ZHAO et al., 2010). No entanto, eles podem ser adaptados a qualquer ambiente demográfico específico. Tendo objetivo de fornecer uma estrutura matemática rigorosa, na qual o usuário final possa inserir parâmetros específicos, ajustados para refletir as condições e as restrições locais.

Apesar de a triagem para CT ter sido implementada há quase duas décadas, países como Estados Unidos, Canadá e da Escandinávia não reportam um declínio sustentado da infecção por CT. No início do programa houve um declínio da prevalência, mas após 1998 aumentou em mais de 50% a prevalência na população pesquisada no início do estudo. Essa expansão é multifatorial, como a reinfeção (aumento de aproximadamente 5%/ano nas mulheres), expansão do rastreio em populações de alto risco e maior sensibilidade dos testes diagnósticos. O tratamento da CT em estágios cada vez mais precoce das infecções acarreta uma hipotética “imunidade presa”, situação na qual o

organismo não consegue produzir imunidade protetora (BRUNHAM; REKART, 2008). Entretanto, um dos objetivos dos programas públicos foi atingido, alcançando a redução de 80% nas taxas de DIP durante os 18 anos de programa (BRUNHAM; REKART, 2009). Como a degradação tecidual é mediada pela resposta imune à clamídia (REKART et al., 2013), a “imunidade presa” também pode estar relacionada a essa diminuição das taxas de DIP e outras sequelas. Visto que a imunologia determina a epidemiologia, o desenvolvimento de uma vacina contra CT seria o próximo passo crucial para o sucesso da prevenção de transmissão, infecção e do desenvolvimento de sequelas inflamatórias (BRUNHAM, RAPPUOLI, 2013).

Certamente, há provas suficientes de que o rastreio primário de CT é importante para evitar DIP. A identificação dos principais fatores que contribuem para a patologia da doença é importante para desenho de futuras vacinas e também permitir a concepção de diagnóstico molecular para a detecção precoce de mulheres (MENON et al., 2015).

Países que já realizam o rastreio de CT como rotina entre mulheres jovens sexualmente ativas obtiveram resultados satisfatórios de custo-efetividade, mesmo quando as prevalências da infecção são baixas (HONEY et al., 2002; NCSSG 2006; AHRQ, 2007). O presente estudo objetivou contribuir para o conhecimento a respeito da prevalência de CT em uma população de baixo risco, porém em idade vulnerável e em fase reprodutiva.

6 CONCLUSÕES

A reação de PCR multiplex padronizada para as amostras endocervicais e de conteúdo vaginal obtidas por autocoleta, possibilitou o controle amostra por amostra da presença do gene da beta globina humana indicando, além da ausência de inibidores da PCR, a presença de células humanas e, portanto, que amostra realmente foi coletada.

A IFD apresentou sensibilidade de 18%, especificidade e VPP 100%, VPN 93%, acurácia 93% e RP negativa 0,82 (acurácia nula), indicando que é um método falho para o diagnóstico da infecção por CT.

A PCR multiplex de amostras vaginais apresentou sensibilidade de 83%, VPN 92%, VPP 100%, acurácia 94% e RP negativa de 0,17 (acurácia moderada) em relação à qPCR (padrão-ouro). O índice kappa calculado em relação à qPCR indicou concordância excelente entre esses dois métodos, habilitando a PCR multiplex como método adequado para o rastreamento de CT em mulheres assintomáticas.

A qPCR é um método mais sensível que a PCR multiplex entre as amostras de conteúdo vaginal, porém seu elevado custo inviabiliza sua utilização como metodologia de rastreamento para CT.

A prevalência de CT entre na população universitária estudada foi 3% (13/435), avaliada pelo rastreamento por autocoleta vaginal e detecção por PCR multiplex.

A faixa etária de 20-21 anos foi a de maior número de detecção de CT, seguida da de 22-23 anos. As duas faixas etárias juntas correspondem a 85% (11) dos casos positivos. A idade de início da atividade sexual variou de 12 a 24 anos, e quanto mais jovem era a participante, mais cedo foi o início de sua atividade sexual.

O número de parceiros sexuais ao longo da vida foi um fator de risco associado à prevalência de CT. Mulheres que tiveram com cinco ou mais parcerias tiveram 76,5% mais chance de ter infecção por CT comparando-se com uma ou duas parcerias sexuais. Entre as amostras positivas, 61% (8) tiveram cinco ou mais parcerias sexuais.

O uso de tabaco foi observado em 4,1% (18) das participantes. Somente 17,5% (76) se declararam abstinências do consumo de álcool e 3,2% (14) declararam uso excessivo de álcool.

A infecção vaginal prévia por outros microrganismos mais comum foi a candidíase (31%) e 14,5% (63) das participantes declararam já ter tido um exame colpocitológico oncológico com resultado alterado. O uso constante de preservativo foi relatado por 27% (120) das participantes, contudo, entre estas, três obtiveram resultado positivo para CT.

A comparação da prevalência de CT do presente estudos com estudos publicados é dificultada pela grande divergência entre as populações estudadas, os métodos de detecção e a amostra clínica utilizada.

Diante destes dados, são necessários mais estudos para melhorar a avaliação da prevalência de CT na população brasileira, incluindo homens e grupos de risco.

O controle da infecção por CT é dificultado por diferentes fatores de qualidade da metodologia e da amostragem, a falta de programas de rastreio ou a baixa adesão da população quando implementados, portanto, o desenvolvimento de vacinas eficazes contra CT vem sendo apontado como fator imprescindível para a diminuição consistente das taxas de infecção por CT.

7 PERSPECTIVAS

Analisar os fatores que possam aumentar a sensibilidade da PCR multiplex para detecção de CT em amostras de autocoleta vaginal, como a troca de reagentes. Reagentes um pouco mais caros, como, por exemplo, a Taq DNA polimerase *hotstart* devem ser testados porque, uma vez que iniciam sua atividade mais tarde, podem aumentar a eficiência da reação até os últimos ciclos de amplificação, tornando seus resultados comparáveis aos da qPCR, que amplificaram três amostra, com muito pouco DNA, praticamente nos últimos ciclos da reação. E

também, melhorar os fatores pré-analíticos, como as orientações para obtenção da amostra por autocoleta, no sentido de ter mais garantia de que as mulheres entendam bem as instruções de coleta e a importância da qualidade da amostra para o resultado final do exame.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFRAKHTEH, M. *et al.* Iranian Journal of Reproductive Medicine, v. 11, n. 4, p. 285-292, 2013.
- AGRAWAL, T., *et al.* Mucosal and peripheral immune responses to chlamydial heat shock proteins in women infected with CT. Clin Exp Immunol. v. 148, p. 461–468, 2007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365.2214.12365.x> >. Acesso em: <abril de 2015>.
- AGUILERA-ARREOLA, MG, * Highly specific and efficient primers for in-house multiplex PCR detection of CT, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. BMC Research Notes.v.7 p.433, 2014.
- AHMED, S. M. *et al.* Immunity in the female lower genital tract and the impact of HIV infection. Scandinavian Journal of Immunology, v. 54, p. 225-238, 2001.
- AHRQ - Agency for Healthcare Research and Quality. Screening for Chlamydial Infection: Clinical Summary of US Preventive Services Task Force. Rockville, 2007. Disponível em: < <http://www.ahrq.gov/clinic/uspstf07/chlamydia/chalcsu.htm> > Acesso em maio de 2014.
- ALLAN, L. A.; CLARKE, P.R. Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. Federation of European Biochemical Societies Journal, v. 276, p. 6063-73, 2009.
- ALTMAN, D. G. Practical statistics for medical research. London: Chapman and Hall, 1991.
- AUSTRALIA. Department of health, Australian Government. National Notifiable Diseases Surveillance System. Disponível em: < <http://www9.health.gov.au/cda/source/cda-index.cfm> >. Acesso em: janeiro 2015.
- BACHMANN, L. H. *et al.* Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* and CT rectal infections. Journal of Clinical Microbiology, v. 48, n. 5, p. 1827-1832, 2010.

BACHMANN, L. H. *et al.* Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* oropharyngeal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 4, p. 902-907, abr. 2009.

BARBEYRAC, B. Current aspects of CT infection. *Presse Médicale*, v. 42, n. 4, p. 440-445, 2013.

BARBEYRAC, B., *et al.* Current aspects of CT infection. *Presse Médicale*, v. 42, n.4, p. 440-445, 2013.

BARROS, N. K. S. *et al.* O papel da associação das infecções por Papilomavírus humano e a CT no desenvolvimento do câncer cervical. *Revista eletrônica de farmácia*, v.4, n.2, p. 114-8, 2007.

BARRY, P. M. *et al.* Results of a program to test women for rectal chlamydia and gonorrhoea. *Obstetrics & Gynecology*, v. 115, n. 4, p. 753-759, 2010.

BART, V. *et al.* Anal infections with concomitant CTgenotypes among men who have sex with men in Amsterdam, the Netherlands. *BMC Infectious Diseases*. v. 14, p. 464, 2014.

BATTEIGER, B.E. *et al.* Repeated CT Genital Infections in Adolescent Women. *Journal of Infectious Diseases*, v. 201, n. 1, p. 42–51, 2010.

BAZAN, J. A. *et al.* High prevalence of rectal gonorrhea and Chlamydia infection in women attending a sexually transmitted disease clinic. *Journal of Women's Health (Larchmt)*. v. 24, n. 3, p. 182-9, 2015.

BERNSTEIN, K. T. *et al.* Rectal gonorrhea and chlamydia reinfection is associated with increased risk of HIV seroconversion. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, v. 53, n. 4, p. 537–543, 2010.

BHENGRAJ, A. R. *et al.* Decreased susceptibility to azithromycin and doxycycline in clinical isolates of CT obtained from recurrently infected female patients in India. *Chemotherapy* v. 56, p. 371–377, 2010.

BJARTLING, C. *et al.* Clinical manifestations and epidemiology of the new genetic variant of CT. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 36, p. 529-535, 2009.

BLANDFORD, J. M.; GIFT, T. L. Productivity losses attributable to untreated chlamydial infection and associated pelvic inflammatory disease in reproductive-aged women. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 33, p. 117–21, 2006.

BOBO, L. *et al.* Diagnosis of CT cervical infection by detection of amplified DNA, with an enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, v.28, p. 1968-1973, 1990.

BOISVERT, J-F. *et al.* Clinical features of CT rectal infection by serovar among homosexually active men. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 26, p. 392–8, 1999.

BOM, R. J, *et al.* Distinct transmission networks of CT in men who have sex with men and heterosexual adults in Amsterdam. The Netherlands. *PLoS One*. v.8, n.1, 2013.

BORBOREMA-ALFAIA, A. B. *et al.* CT infection in a sample of northern Brazilian pregnant women: prevalence and prenatal importance. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* [online]. v. 17, n. 5, p. 545-550, 2013.

BOSCH, F. X.; DE SANJOSE, S. Chapter 1: Human Papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *Journal National Cancer Institute Monographs*, v. 31, p. 3-13. 2003.

BRABIN, L. *et al.* Factors affecting vaginal pH levels among female adolescents attending genitourinary medicine clinics. *Sexually Transmitted Infections*, v. 81, p. 483-487, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conhecimentos, Atitudes e Práticas na População Brasileira. Brasília, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de controle de DST. 3ªed. Brasília(DF); 1999. Disponível em: <http://www.acemfc.org.br/modelo1/down/manual_controle_dst.pdf>. Acesso em maio de 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de controle de DST. 4ªed. Brasília(DF); 2006. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_controle_das_dst.pdf>. Acesso em maio de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT). Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST). Brasília. 2015. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/publicacao/2015/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-atencao-integral-pessoas-com-infeccoes-s>>. Acesso em: dezembro de 2015.

BRASIL. Secretaria Nacional Antidrogas. Glossário de álcool e drogas. Brasília. 2006.

BRUNHAM, R. C. *et al.* The unexpected impact of a CT infection control program on susceptibility to reinfection. *Journal of Infectious Diseases*. v. 192. n. 10 p. 1836-44, 2005.

BRUNHAM, R. C.; PEELING, R. W. CT antigens: role in immunity and pathogenesis. *Emerging Infectious Diseases*, v. 3, n. 5. p. 218-233, 1994.

BRUNHAM, R. C.; RAPPUOLI, R. CT control requires a vaccine. *Vaccine*. v. 31. p. 1892-97, 2013.

BRUNHAM, R. C.; REKART, M. L. Considerations on CT disease expression. *Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology*, v. 55, n. 2, p. 163-6, 2009.

BRUNHAM, R. C.; REKART, M. L. The arrested immunity hypothesis and the epidemiology of chlamydia control. *Sexually Transmitted Infections*, v. 35, n. 1 p. 53-54, 2008.

BRUNHAM, R.; REY-LADINO, J. Immunology of chlamydia infection: implications for a chlamydia trachomatis vaccine. *Nature Reviews Immunology* v. 5, p. 149-161, 2005.

BUIMER, M. *et al.* Detection of CT and *Neisseria gonorrhoeae* by Ligase chain reaction-based assays with clinical specimens from various sites: implications for diagnostic testing and screening. *Journal of Clinical Microbiology*. v.34, p. 2395 – 2400, 1996.

BUSTIN, S. A. A-Z of Quantitative PCR. 1. ed. La Jolla: International University Line, 2004.

BYRNE, G. I.; MOULDER, J. W. Parasite-specified phagocytosis of *Chlamydia psittaci* and CT by L and HeLa cells. *Infection and Immunity*, v. 19, n. 2, p. 598-606, fev. 1978.

CARLSON, J. H. *et al.* The CT Plasmid Is a Transcriptional Regulator of Chromosomal Genes and a Virulence Factor. *Infection and immunity*, v. 76, n. 6, p. 2273-83, jun. 2008.

CARLSON, J. H., * The CT plasmid is a transcriptional regulator of chromosomal genes and a virulence factor. *Infect Immun.* v. 76, p. 2273-2283, 2008.

CARTER, J. D.; HUDSON, A. P. The evolving story of *Chlamydia*-induced reactive arthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, v. 22, n. 4, p. 424-30, jul. 2010.

CARVALHO, S. N. *et al.* Prevalência da infecção por CT em parturientes jovens atendidas em uma maternidade pública. *DST-Jornal brasileiro de Doenças Sexualmente Transmitidas*. v. 22, n. 3, p. 141-144, 2010.

CATES, W. J.; WASSERHEIT, J. N. Genital *Chlamydia* infections: epidemiology and reproductive sequelae. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, v. 164, p. 1771-1781, jun. 1991.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Incidence, prevalence, and cost of sexually transmitted infections in the United States. <http://www.cdc.gov/std/stats/sti-estimates> -fact-sheet-feb-2013.pdf. CDC, Atlanta, GA.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Recommendations for the Laboratory-Based Detection of CT and *Neisseria gonorrhoeae* — 2014. *MMWR*. v.63, n.2, 2014.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2011 Sexually Transmitted Diseases Surveillance: *Chlamydia*. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/std/stats11/chlamydia.htm>>. Acesso em: 9 de outubro de 2013.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Association of Public Health Laboratories. Laboratory diagnostic testing for *Treponema pallidum*, Expert Consultation Meeting Summary

Report, January 13-15, 2009, Atlanta, GA. Disponível em: <http://www.aphl.org/aphlprograms/infectious/std/Documents/ID_2009Jan_Laboratory-Guidelines-Treponema-pallidum-MeetingReport.pdf>. 2009.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Reported STDs in the United States: 2014 National Data for Chlamydia, Gonorrhea, and Syphilis. Atualizada em novembro de 2015. Disponível em: <http://www.cdc.gov/std/stats14/default.htm>. Acesso em dezembro de 2015.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/std/treatment/2010/default.htm>>. Acesso em: Novembro de 2012.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. STDs in Adolescents and Young Adults. Atualizada em novembro de 2015. Disponível em: <http://www.cdc.gov/std/stats14/adol.htm>>. Acesso em dezembro de 2015.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.. Male Chlamydia Consultation, March 28-29, 2006, Atlanta, GA. Meeting report, May 22, 2007.

CHEN, M.Y. *et al.* Screening pregnant women for chlamydia: what are the predictors of infection? Sexually Transmitted Infections, v. 85, p. 31-35, 2009.

CHERNESKY, M. *et al.* Head-to-head comparison of second-generation nucleic acid amplification tests for detection of CT and *Neisseria gonorrhoeae* on urine samples from female subjects and self-collected vaginal swabs. Journal of Clinical Microbiology, v. 52, n. 7, p. 2305-10, 2014.

CHERNESKY, M. *et al.* High analytical sensitivity and low rates of inhibition may contribute to detection of CT in significantly more women by the APTIMA Combo 2 assay. Journal of Clinical Microbiology, v. 44, p. 400–405, 2006.

CHOROSZY-KRÓL, I.C.; FREJ-MADRZAK, M.; JAMA-KMIECIK, A.; BOBER, T.; AROWSKA, J. Characteristics of the CT species–

Immunopathology and Infections. Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University, v. 21, n. 6, p. 799-808, 2012.

CHUDZICKA-STRUGAŁA, I. *et al.* Occurrence of CT infections in infertile women in Poland. *Ginekologia polska*, v. 85, n. 11, p. 843-6, nov. 2014.

CLARKE, I. N. Evolution of CT. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1230, p. E11–E18, 2011.

CODES, J. S. *et al.* Detecção de doenças sexualmente transmissíveis e não clínicas na cidade de Salvador Bahia, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, v. 22, n. 3, p. 25-34, 2006.

COMANDUCCI, M. *et al.* Diversity of the CT common plasmid in biovars with diferente pathogenicity. *Plasmid*, v. 23, n. 2, p. 149-154, 1990.

CONEJERO, C. *et al.* Screening of *Neisseria gonorrhoeae* and CT using techniques of self-collected vaginal sample in young women. *Revista Chilena de Infectologia*, v. 30, p. 489-93, 2013.

CREIGHTON, S. *et al.* Co-infection with gonorrhea and chlamydia: how much is there and what does it means? *International Journal of STD & AIDS*, v. 14, p. 109-113, 2003.

DAROUGAR, S. *et al.* Chlamydial infection. Advances in the diagnostic isolation of Chlamydia, including TRIC agent, from the eye, genital tract, and rectum. *The British Journal of Venereal Diseases*, v. 48, n. 6, p. 416–20, dez. 1972.

DI FELICE, V. *et al.* Is chlamydial heat shock protein 60 a risk factor for oncogenesis? *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.62, n.1, p.4-9, 2005.

DICLEMENTE, R. J.; SALAZAR, L. F.; CROSBY, R. A. A review of STD/HIV preventive interventions for adolescents: sustaining effects using an ecological approach. *Journal of Pediatric Psychology*, v. 32, n. 8, p. 888-906, 2007.

DIZE, L., * 2015. Stability of CT on storage of dry swabs for accurate detection by nucleic acid amplification tests. *J Clin Microbiol.* v. 53, p. 1046–1047, 2015.

DOSHI, J.S.; POWER, J.; ALLEN, E. Acceptability of chlamydia screening using self-taken vaginal swabs. *International Journal of STD & AIDS*, v. 19, p. 507–9, 2008.

DRUMMOND, F. *et al.* Is azitromicin adequate treatment for asymptomatic retal chlamydia? *International Journal of STD & AIDS*, v. 22, n. 8, p. 478-480, jul. 2011.

DUKERS-MUIJERS, N.H. *et al.* Detection of anorectal and cervicovaginal CT infections following azitromicina treatment: prospective cohort study with multiple time-sequential measure of rRNA, DNA, quantitative load and symptoms. *Plos One* v. 8, n. 11, e81236, nov. 2013.

EIDE, M. L.; DEBAQUE, H. HPV detection methods and genotyping techniques in screening for cervical cancer. *Annals of Diagnostic Pathology*, v. 32, n. 6, p. e15–e23, 2012.

EQUILS, O. *et al.* Bacterial lipopolysaccharide activates HIV long terminal repeat through Toll-like receptor 4. *The Journal of Immunology*, v. 166. n. 4, p. 2342-2347, 2001.

Expert Advisory Group. CT – Summary and Conclusions of CMO's Expert Advisory Group. London: Department of Health; 1998.

FAIRLEY, C. K. *et al.* Doctor, How Long Has My Chlamydia Been There? Answer:... Years. *Sexually Transmitted Diseases* v. 34, n. 9, p. 727–8, 2007.

FERNÁNDEZ-BENÍTEZ, C., *et al.* Prevalence of genital CT infection among young men and women in Spain. *BMC Infectious Diseases*, v. 13, n. 388, p. 1-8, 2013.

FIELDS, K. A.; HACKSTADT, T. The chlamydial inclusion: escape from the endocytic pathway. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 18, p. 221-245, 2002.

FORHAN, S. E. *et al.* Prevalence of sexually transmitted infections among female adolescents aged 14 to 19 in the United States. *Pediatrics*, v. 124, n. 6, p.1505-12, nov. 2009.

FRIAS, M. C. A. A. *et al.* Frequência de CT, *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* na endocérvice de mulheres no menacme. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, v. 13, p. 5-22, 2001.

FROMMELL, J. T. *et al.* Chlamydial infection of mothers and their infants. *Journal of Pediatrics*, v. 95, p. 28-32, 1979.

GARCÊS, A. X. *et al.* Prevalência de CT e outros fatores de risco associados à infecção detectada em amostra endocervical. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 35, n. 8, p. 379-383, 2013.

GAYDOS, C. A.; *et al.* Comparison of Three Nucleic Acid Amplification Tests for Detection of CT in Urine Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n.7, p. 3041–3045, 2004.

GAYDOS, C. A.; *et al.* Internet based screening for CT to reach non-clinic populations with mailed self-administered vaginal swabs. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 33, n. 7, p. 451–457, 2006.

GAYDOS, C. *et al.* Performance of the APTIMA Combo 2 assay for detection of CT and *Neisseria gonorrhoeae* in female urine and endocervical swab specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, p. 304-309, 2003.

GOLFETTO, L. *et al.* Detecção do HPV e da CT em amostras de cérvix uterina de mulheres da cidade de São Miguel do Oeste. 2014 f.147. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GILBERT, D. N. *et al.* The Sanford guide to antimicrobial therapy. Sperryville, VA: Antimicrobial Therapy, Inc. p. 20, 2011.

GIRALDO, P. Enfoque atual sobre a infecção genital por CT. DST- *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, v. 12, n. 3, 2000.

GIRDNER, J. L. *et al.* Evaluation of the Digene Hybrid Capture II CT-ID test for detection of CT in endocervical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 1579-1581, 1999.

GOTTLIEB, S. L. *et al.* Introduction: The Natural History and Immunobiology of CT Genital Infection and Implications for Chlamydia Control. *Journal of Infectious Diseases*, Suppl. 2, 201, p. S85-S87, 2010.

GRASECK, A. S. *et al.* Home Compared With Clinic-Based Screening for Sexually Transmitted Infections: A Randomized Controlled Trial. *Obstetrics & Gynecology*, v. 116, n. 6, p. 1311-1318, 2010.

GREENDALE, G. A. *et al.* The relationship of CT infection and male infertility. *American Journal of Public Health*, v. 83, p. 996-1001, 1993.

GRIFFAIS R.; THIBON M. Detection of CT by the polymerase chain reaction. *Revista de Microbiologia.*, v. 1, n. 140, p. 7-16, 1989.

GUY, R. *et al.* Interventions to increase rescreening for repeat chlamydial infection. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 39, n. 2, p. 136-146, 2012.

HACKSTADT, T. *et al.* Origins and function of the chlamydial inclusions. *Trends in Microbiology*. v. 5, p. 288-293, 1997.

HAGGERTY, C. L. *et al.* Risk of sequelae after CT genital infection in women. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 202, p. S134-S155, 2010.

HAMASUNA, R. *et al.* Usefulness of real-time PCR in detecting CT and *Neisseria gonorrhoeae* in endocervical swabs and first-voided urine specimens. *Kansenshogaku Zasshi*. v. 87 (5 Suppl 8), p. 17-23, set. 2013.

HARRIS, S. R. *et al.* Whole-genome analysis of diverse CT strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing. *Nature Genetics*. v. 44, n. 4, p. 413-9, S1, abr. 2012.

HEIJNE, J. *et al.* Uptake of regular chlamydia testing by U. S. women: a longitudinal study. *American Journal of Preventive Medicine*, v. 39, n. 3, p. 243-50, 2010.

HOCKING, J. S. *et al.* Advances in sampling and screening for chlamydia. *Future Microbiology*, v. 8, p. 367-386, 2013.

HOCKING, J. S.; GUY, R.; WALKER, J.; TABELIZI S. N. Advances in sampling and screening for chlamydia. *Future Microbiology*, v.8, p. 367-386, 2013.

HOGAN, R. J., *et al.* Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect Immun.* v. 72, p. 1843–1855, 2004.

HOLLAND, S. M. *et al.* Demonstration of chlamydial RNA and DNA during a culture negative state. *Infection and Immunity*, v. 60, n. 5, p. 2040-2047, 1992.

HOOVER, K. W.; TAO, G.; KENT, C. K. Trends in the diagnosis and treatment of ectopic pregnancy in the United States. *Obstetrics & Gynecology*, v. 115, n. 3, p. 495–502, 2010.

HOSENFELD, C. B. *et al.* Repeat infection with Chlamydia and gonorrhea among females: a systematic review of the literature. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 36, n. 8, p. 478-489, ago. 2009.

HSIEH, Y-H. *et al.* Preference among female army recruits for use of self-administered vaginal swabs or urine to screen for CT genital infections. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 30, p. 769–73, 2003.

HUANG, W. *et al.* Cost-effectiveness Analysis of. CT Screening Via Internet-based Self-collected Swabs Compared With Clinic-based Sample Collection. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 38, n. 9, p. 815-820, 2011.

HUDSON, A. P. A Major Advance in Elucidating the Biology/Pathobiology of CT Infection and Immunity, v. 81, n. 3, p. 622– 624, 2013.

HUPPERT, J.; HESSE, E.; GAYDOS, C. A.; What's the point: How point-of-care STI tests can impact infected patients. *Point Care*. v. 9, p. 36-46, 2010.

JACOBSON, D. L., *et al.* Histologic development of cervical ectopy: relationship to reproductive hormones. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 27, n. 5, p. 252-258, 2000.

JALAL, H. *et al.* Development and Validation of a Rotor-Gene Real-Time PCR Assay for Detection, Identification, and Quantification of CT in a Single Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, n. 1, p. 206-213, jan. 2006.

JALIL, E.M. *et al.* Prevalence of Chlamydia and *Neisseria gonorrhoeae* infections in pregnant women in six Brazilian cities. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 30, n. 12, p. 614-619, 2008.

JENKINS, W. *et al.* Use of the internet and self-collected samples as a sexually transmissible infection intervention in rural Illinois communities. *Sexual Health*, v. 18, n. 1, 2011.

JEREMIAS, J.; MOCKEL, S.; WITKIN, S. S. Human semen induces interleukin 10 and 70 kDa heat shock protein gene transcription and inhibits interferon-gamma messenger RnA production in peripheral blood mononuclear cells. *Molecular Human Reproduction*, v. 4, p. 1084-1088, 1998.

JONES, B. R.; AL-HUSSAINI, M. K.; DUNLOP, E. M. Infection of the eye and the genital tract by the TRIC agent. *The British Journal of Venereal Diseases*, v. 40, p. 19-24, 1964.

KAMWENDO, F. *et al.* Decreasing incidences of gonorrhea- and chlamydia-associated acute pelvic inflammatory disease: a 25-year study from an urban area of central Sweden. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 23, p. 384-391, 1996.

KELLY, K. A. Cellular immunity and chlamydia genital infection: induction, recruitment, and effector mechanisms. *International Reviews of Immunology*, v. 22, p. 3-41, 2003.

KHADER, S. A., GOPAL, R. 2010. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens. *Virulence*. v. 1, p. 423-427. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4161/viru.1.5.12862> > . Acesso em: < julho de 2015>.

KIRCHHOFF, S. R., GUPTA, S.; KNOWLTON, A. A. Cytosolic heat shock Protein 60, apoptosis and myocardial injury. *Circulation*, v.105, n.24, p.2899–2904, 2002.

KLEBA, B. [amp] STEPHENS, R. S. Chlamydial effector proteins localized to the host cell cytoplasmic compartment. *Infect Immun*. v. 76, p. 4842–4850, 2008.

KNOX, J. *et al.* Evaluation of self-collected samples in contrast to practitioner-collected samples for detection of CT, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Trichomonas vaginalis* by polymerase chain reaction among women living in remote areas. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 29, p. 647–54, 2002.

KONG, F. Y. S. *et al.* Australian general practitioner chlamydia testing rates among young people. *Medical Journal of Australia*, v. 194, p. 249–252, 2011.

LAND, J. A. *et al.* Epidemiology of CT infection in women and the cost-effectiveness of screening. *Oxford Journals Medicine- Human Reproduction Update*, v. 16, p. 189–204, 2009.

LEONHARDT, R. M. *et al.* Severe Tryptophan Starvation Blocks Onset of Conventional Persistence and Reduces Reactivation of CT. *Infection and Immunity*. v. 75, n. 11, p. 5105–17, 2007.

LEWIS, D., *et al.* The prevalence of CT infection in Australia: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*. v. 12, p. 113, 2012.

LIAW, S. T., BOYLE, D. Primary care informatics and integrated care. *Stud Health Technol Inform*. v. 151, p. 255–268, 2010.

LINDQUIST, T. B. Ophthalmia neonatorum. In: KRACHMER, J. H.; MANNIS, M. J.; HOLLAND, E. J. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Manegment*. 3^a ed. v.1. New York: Mosby Elsevier; p.553–8. 2011.

LOOMIS, W. P.; STARNBACH, M. N. T cell responses to CT. *Current Opinion in Microbiology*, v. 5, p. 87–91, 2002.

LOW, N. Screening programmes for chlamydial infection: when will we ever learn? *British Medical Journal*, v. 334, n. 725, p. 725–728, 2007.

MABEY, D.; PEELING, R. W. Lymphogranuloma venereum. Sexually Transmitted Infections, v. 78, p. 90-2, 2002.

MACHADO, M. S. *et al.* Prevalence of cervical CT infection in sexually active adolescents from Salvador, Brazil. Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 16, n. 2, p. 188-91, 2012.

MACLEOD, J., *et al.* Coverage and uptake of systematic postal screening for genital CT and prevalence of infection in the United Kingdom general population: cross sectional study. BMJ. v. 330, p. 940–942, 2005.

MAHILUM-TAPAY, L. *et al.* New Point of Care Chlamydia Rapid Test – bridging the gap between diagnosis and treatment: performance evaluation study. Brazilian Journal of Microbiology, v. 335, p. 1190-4. 2007.

MAK, D. B., WATKINS, R.E. Improving the accuracy of Aboriginal and non-Aboriginal disease notification rates using data linkage. BMC Health Services Research. v. 8, p. 118, 2008.

MALHOTRA, M. *et al.* Genital CT: an update. Indian Journal of Medical Research. v. 138, n. 3, p. 303–16, set. 2013.

MANAVI, K. A review on infection with CT. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology, v. 20, n. 6, p. 941-951, 2006.

MONTEIRO, E. F.; LACEY, C. J.; MERRICK, D. The interrelation of demographic and geospatial risk factors between four common sexually transmitted diseases. Sexually Transmitted Infections, v. 81, p. 41-46, 2005.

MARQUES, C. A. S. *et al.* Infecção genital por CT em casais atendidos em ambulatório de esterilidade conjugal. DST-Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis, v. 19, n. 1, p. 5-10, 2007.

MARRA, F. *et al.* Epidemiology and costs associated with genital warts in Canada. Sexually Transmitted Infections, v. 85, n. 2, p. 111–115, 2009.

MASCELLINO, M. T., BOCCIA, P., OLIVA, A. 2011. Immunopathogenesis in CT infected women. ISRN Obstet Gynecol. 2011.

MASEK, B. J. *et al.* Performance of three nucleic acid amplification tests for detection of CT and *Neisseria gonorrhoeae* by use of self-collected vaginal swabs obtained via an Internet-based screening program. Journal of Clinical Microbiology, v. 47, p. 1663–7, 2009.

MEDEIROS, A. L. P. B *et al.* CT: diagnóstico Citológico e por Imunofluorescência Direta em uma amostra de mulheres do grande Recife. Revista Brasileira de Análises Clínicas, v. 39, p. 43-46, 2007.

MICHEL, C. C. *et al.* CT load at matched anatomical sites: Implications for screening strategies. Journal of Clinical Microbiology, v. 45, p. 1395-402, 2007.

MIMIAGA, M. J. *et al.* Asymptomatic gonorrhea and chlamydial infections detected by nucleic acid amplification tests among Boston area men who have sex with men. Sexually Transmitted Diseases, v. 35, n. 5, p. 495-498, mai, 2008.

MIYASHITA, N. *et al.* The 7.5-kb common plasmid is unrelated to the drug susceptibility of CT. Journal of Infection and Chemotherapy, v. 7, n. 2, p. 113-116, jun. 2001.

MORRISON, R. P. Differential sensitivities of CT strains to inhibitory effects of gamma interferon. Infect Immun. v. 68, p. 6038 –6040, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.68.10.6038-6040>> . 2000. Acesso em: <maio de 2015>.

MOULDER, J. W. Interaction of Chlamydiae and host cells in vitro. Microbiological reviews, v. 55, n. 1, p. 143-190, 1991.

MPIGA, P.; RAVAOARINORO, M. CT persistence: an update. Microbiological Research, v. 161, n. 1, p. 9–19, 2006.

MURAILLE. E., LEO, O. Revisiting the Th1/Th2 paradigm. Scand J Immunol. v. 47, p.1–9, 1998.

NCSSG - National Chlamydia Screening Steering Group. New Frontiers: Annual report of the National Chlamydia Screening Programme in England 2005/06. London: Health Protection Agency, 2006.

NELSON, D. E., *et al.* 2005. Chlamydial IFN-gamma immune evasion is linked to host infection tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10658–10663. < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0504198102> >.

NEWMAN, L. *et al.* Australia's notifiable disease status, 2008: annual report of the National Notifiable Diseases Surveillance System. *Communicable diseases intelligence*, v. 34, p. 157-224, 2010.

NGUYEN, B. D., VALDIVIA, R. H. Virulence determinants in the obligate intracellular pathogen CT revealed by forward genetic approaches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* v. 109, p. 1263–1268, 2012.

NOVAIS, C. M.; ALVES, M. P. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 33, p.10-13, 2004.

OLIVEIRA, M. L. Infecção por CT em pacientes com e sem lesões intra-epiteliais cervicais. Dissertação (Mestre em Saúde Materno-Infantil)- Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira, 74f, Brasil, 2007.

OSTERGAARD, L. Diagnosis of urogenital CT infection by use of DNA amplification. *APMIS Suppl*, v. 89, p. 5-36, 1999.

OWUSU-EDUSEI, K. *et al.* The estimated direct medical cost of selected sexually transmitted infections in the United States, 2008. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 40, p. 197–201, 2013.

PAAVONEN, J. CT infections of the female genital tract: State of the art. *Annals of Medicine*, n. 44, p. 18–28, 2012.

PALMER, L.; FALKOW, S. A common plasmid of CT. *Plasmid*, v. 16, n. 1, p. 52-62, 1986.

PANATTO, D. *et al.* CT prevalence and chlamydial/HPV co-infection among HPV-unvaccinated young Italian females with normal cytology.

Human Vaccines and Immunotherapeutics, v. 11, n. 1, p. 270-276, ago. 2014.

PAPP, J. R. *et al.* Recommendations for the laboratory-based detection of CT and *Neisseria gonorrhoeae*—2014. Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports, v. 63(No. RR-02), 2014.

PEIPERT, J. F. Clinical Practice. Genital chlamydial infections. The New England Journal of Medicine, v. 349, p. 2424-2430, 2003.

PICKET, M. A. *et al.* The plasmids of CT and *Chlamydia pneumoniae* (N16): accurate determination of copy number and the paradoxical effect of plasmid-curing agents. Microbiology, v. 151, p. 893-903, 2005.

PINTO, V. M. *et al.* CT prevalence and risk behaviors in parturient women aged 15 to 24 in Brazil. Sexually Transmitted Diseases, v. 38, n. 10, p. 957-961, 2011.

POLJAK, M. *et al.* Nucleic acid tests for the detection of alpha human papillomaviruses. Vaccine, v. 30(Suppl 5), p. 100–F106, 2012.

PUDNEY, J.; QUAYLE, A. J.; ANDERSON, D.J. Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. Biology of Reproduction, v. 73, p. 1253-1263, 2005.

QUAYLE, A. J. The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. Journal of Reproductive Immunology, v. 57, p. 61-79, 2002.

QUINN, T. C. *et al.* CT proctitis. The New England Journal of Medicine, v. 305, p. 195–200, 1981.

QUINT, K. D. *et al.* Anal infections with concomitant CT genotypes among men who have sex with men in Amsterdam, the Netherlands. BMC Infectious Diseases, v. 11, n. 73, p. 43 – 71. 2011

REKART, M. L. *et al.* Chlamydia public health programs and the epidemiology of pelvic inflammatory disease and ectopic pregnancy. The Journal of Infectious Diseases, v. 207, n. 1, p. 30-8. 2013.

REKART, M. L.; BRRUNHAM, M. C. Epidemiology of chlamydial infection: are we losing ground? *Sexually Transmitted Infections*, v. 84 p. 87-91, 2008.

RENAULT, C. A. *et al.* Time to clearance of CT ribosomal RNA in women treated for chlamydial infection. *Sex Health*, v. 8, n. 1, p. 69–73, 2011.

RIDGWAY, G. L. *et al.* Comparison of the ligase chain reaction with cell culture for the diagnosis of CT infection in women. *Journal of Clinical Pathology*, v. 49, n. 2, p. 116–9, 1996.

RIPA, T.; NILSSON, P. A variant of CT with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro. Surveill.* v. 11, n. 11, E061109, nov. 2006.

RIVERO, E. R. *et al.* Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathology Research Practice*, v. 202, n.7, p.523-529, 2006.

ROCKEY, D. D., LENART, J. [amp] STEPHENS, R. S. Genome sequencing and our understanding of chlamydiae. *Infect Immun.* v. 68, p. 5473–5479, 2000.

ROYMANS, R. T.; ONLAND, G.; POSTMA, B. H. One-day detection of PCR amplified CT DNA in clinical samples: ELISA versus Southern blot hybridisation. *Journal of Clinical Pathology*, v. 49, n. 7, p.581-583, 1996.

SAIKI, R. K., *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v.239, n.4839, p. 487-491, 1988.

SAMRA, Z., S. *et al.* Dan. In vitro susceptibility of recent clinical isolates of CT to macrolides and tetracyclines. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 39, n. 3, p. 177–179, 2001.

SATTERWHITE, C. *et al.* Sexually transmitted infections among US women and men: prevalence and incidence estimates, 2008. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 40, n. 3, p. 187-93, 2013.

SCHACHTER, J. Chlamydiae (Psittacosis – Lymphogranuloma Venereum-Trachoma group), p. 856 – 862 In LENNETTE, E. H. *et al.* Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. American Society of Microbiology, Washington, D.C. 1985.

SCHACHTER, J. *et al.* Noninvasive tests for diagnosis of CT infection: application of ligase chain reaction to first-catch urine specimens of women. The Journal of Infectious Diseases, v. 172, p. 1411–4, 1995.

SCHACHTER, J. *et al.* Vaginal swabs are appropriate specimens for diagnosis of genital tract infection with CT. Journal of Clinical Microbiology, v. 41, n. 8, p. 3784–9, 2003.

SCHACHTER, J. *et al.* Vaginal swabs are the specimens of choice when screening for CT and *Neisseria gonorrhoeae*: results from a multicenter evaluation of the APTIMA assays for both infections. Sexually Transmitted Diseases, v. 32, p. 725–8, 2005.

SCHACHTER, J. Medical progress: chlamydial infections (third of three parts). The New England Journal of Medicine, v. 298, p. 540-549, 1978.

SCHACHTER, J.; PHILIP, S. S. Testing men who have sex with men for urethral infection with CT and *Neisseria gonorrhoeae* is only half of the job, and we need the right tools. Sexually Transmitted Diseases, v. 38, n. 10, p. 925-927, 2011.

SCHACHTER, J.; STAMM, E. W. CT. In: MURRAY, P. R.; BARON, E.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington, D.C: ASM Press, 1999.

SCHACHTER, J.; STEPHENS, R. S. Biology of CT. In: Sexually Transmitted Disease (4th Edition). Holmes KK, Sparling PF, Stamm WE *et al.* (Eds). McGraw-Hill, NY, USA, 555–574 2008.

SCHIFFMAN, M. *et al.* Human papillomavirus and cervical cancer. Lancet, v. 370, p. 890-907, 2007.

SCHOLLES, D. *et al.* Prevention of pelvic inflammatory disease by screening for cervical chlamydial infection. The New England Journal of Medicine, v. 334, p. 1362–6, 1996.

SCOTT LAMONTAGNE, D. *et al.* Incidence and reinfection rates of genital chlamydial infection among women aged 16–24 years attending general practice, family planning and genitourinary medicine clinics in England: a prospective cohort study by the Chlamydia Recall Study Advisory Group. Sexually Transmitted Infections, v. 83, n. 4, p. 292–303, 2007.

SEADI, C. F. *et al.* Diagnóstico laboratorial da infecção pela CT: vantagens e desvantagens das técnicas. J. Bras. Patol. Med. Lab., vol. 38, n. 2, 2002.

SETH-SMITH, H. M. *et al.* Co-evolution of genomes and plasmids within CT and the emergence in Sweden of a new variant strain. BMC Genomics, v. 10, 2009.

SEXTON, M. E. *et al.* How reliable is self-testing for gonorrhea and chlamydia among men who have sex with men? The Journal of Family Practice, v. 62, n. 2, p. 70-78, 2013.

SHAFFER, M-A. *et al.* Comparing first-void urine specimens, self-collected vaginal swabs, and endocervical specimens to detect CT and *Neisseria gonorrhoeae* by a nucleic acid amplification test. Journal of Clinical Microbiology, v. 41, p. 4395–9, 2003.

SHEW, M. L. *Association of CT infection with redetection of human papillomavirus after apparent clearance. Journal of Infectious Diseases. v. 208, n. 9, p. 1416-1421, 2013.

SHOBORG, R.V. Chlamydia persistence – A toll to dissect Chlamydia-host interactions. Microbes Infect. v.13, n.7 p. 649–662. 2011.

SIEVING, R. E. *et al.* A clinic-based youth development program to reduce sexual risk behaviors among adolescent girls: prime time pilot study. Health Promotion Practice, v. 13, n. 4, p. 462-71, 2012.

SILVA, M. J. P. M. A. *et al.* O valor do rastreamento da infecção por clamídia na redução da morbidade do trato genital feminino. *Revista Brasileira de Genitoscopia*, v. 3, n. 3-4, p. 97-100, 2009.

SIMMS, I. *et al.* The English National Screening Programme: variation in positivity in 2007/2008. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 36, p. 522 – 527, 2009.

SKULNICK, M. *et al.* Use of the polymerase chain reaction for the detection of CT from endocervical and urine specimens in an asymptomatic low-prevalence population of women. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 20, p. 195–201, 1994.

SMITH, K.S. *et al.* Rationale and design of REACT: a randomised controlled trial assessing the effectiveness of home-collection to increase chlamydia retesting and detect repeat positive tests. *BMC Infectious Diseases*, v. 14, n. 223, p. 1-9, 2014.

STAMM, W.E. CT infections of the adult. In: Holmes KK, Sparling FF, Stamm WE., *et al.*, eds. *Sexually transmitted diseases*. 4th ed. New York, NY: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2007:575–94.

STEPHENS, R. S. *et al.* Genome sequence of an obligate intracellular pathogens of humans: CT. *Science*, v. 23, p. 754-759, 1998.

STEPHENS, R. S. The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends in Microbiology*, v. 11, p. 44–51, 2003.

STEWART, D. E. *et al.* Self-collected samples for testing of oncogenic human papillomavirus: a systematic review. *Journal of obstetrics and Gynaecology Canada*, v. 29, p. 817-28, 2007.

STORM, M., I. *et al.* Real-time PCR for pharmacodynamic studies of CT. *Journal of Microbiological Methods*, v. 61, p. 361-367, 2005.

STURM-RAMIREZ, K. *et al.* High levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in bacterial vaginosis may increase susceptibility to human immunodeficiency virus. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 182, p. 467-473, 2000.

SU, W. H. *et al.* Diagnosis of Chlamydia infection in women. Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology, v. 50, p. 261-267, 2011.

TAM, J. E. *et al.* Location of the origin of replication for the 7.5-kb CT plasmid. Plasmid, v. 27, p. 231-236, 1992.

TAO, G., HOOVER, K. W., KENT, C. Chlamydia testing patterns for commercially insured women, 2008. Am J Prev Med. v. 42, n. 4, p.337-41, 2012.

TAO, G.; HOOVER, K. W.; KENT, C. Chlamydia testing patterns for commercially insured women, 2008. American Journal of Preventive Medicine, v. 42, n. 4, p. 337-41, 2012.

TILSON, E. C. *et al.* Barriers to asymptomatic screening and other STD services for adolescents and young adults: focus group discussions. BMC Public Health, 2004, v. 4, n. 21, p. 1-8, 2004.

TINGEY1, L., * Self-administered sample collection for screening of sexually transmitted infection among reservation-based American Indian youth. Int j STD AIDS. v. 26, n. 9, p. 661-666, 2015.

TODD, W. J.; CALDWELL, H. D. The interaction of CT with host cells: ultrastructural studies of the mechanism of release of a biovar II strain from HeLa 229 cells. The Journal of Infectious Diseases, v. 151, n. 6, p. 1037-1044, 1985.

TREBACH, J.D. *et al.* *Neisseria gonorrhoeae* and CT Among Women Reporting Extragenital Exposures. Sexually Transmitted Diseases, v. 42, n. 5, p. 233-9, mai. 2015.

UNEMO, M. *et al.* The Swedish new variant of CT: genome sequence, morphology, cell tropism and phenotypic characterization. Microbiology v. 156, p. 1394–1404, 2010.

UNEMO, M.; CLARKE, I.N. The Swedish new variant of CT. Current Opinion in Infectious Diseases, v. 24, n. 1, p. 62–69, 2011.

UNITED KINGDON. National chlamydia screening programme (NCSP): data tables. Official Statistics. Atualizado em 2015. Disponível em: <https://www.gov.uk/government/statistics/national-chlamydia->

screening-programme-ncsp-data-tables. Acesso em: março de 2015.

UNITED KINGDOM. National Health Service (NHS). Chlamydia. Atualizado em junho/2015. Disponível em: <<http://www.nhs.uk/conditions/Chlamydia/Pages/Introduction.aspx>>. Acesso em julho/2015.

UNITED KINGDOM. PUBLIC HEALTH ENGLAND. Official Statistics: National Screening Chlamydia Program (NSCP): data tables. England, 2015. Disponível em: <<http://www.chlamydia-screening.nhs.uk/ps/index.asp>> e <<https://www.gov.uk/government/collections/chlamydia-surveillance-data-screening-and-management>>. Acesso em: novembro de 2015.

UPCHURCH, D. M. *et al.* Social and behavioral determinants of self-reported STD among adolescents. *Perspectives on Sexual and Reproductive Health*, v. 36, n. 6, p. 276-287, 2004.

VAJDIC, C.M., *et al.* The prevalence of genital CT in Australia 1997–2004: a systematic review. *Sex Health*. v. 2, n. 3, p. 169–183, 2005.

VALDIR MONTEIRO PINTO,* CT Prevalence and Risk Behaviors in Parturient Women Aged 15 to 24 in Brazil. *Sexually Transmitted Diseases*. v. 38, n. 10, 2011.

VAN BUEREN, A. L., *. Identification and structural basis of binding to host lung glycogen by streptococcal virulence factors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* v. 14, p. 76–84, 2007.

VAN DER POL, B. *et al.* Evaluation of the Digene Hybrid Capture II Assay with the Rapid Capture System for Detection of CT and *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 10, p. 3558–3564, 2002.

VAN DER POL, B. *et al.* Vaginal swabs are the optimal specimen for detection of genital CT or *Neisseria gonorrhoeae* using the cobas 4800 CT/NG test. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 40, p. 247–250, 2013.

VAN LIERE, G. A. F. S. *et al.* High co-occurrence of anorectal chlamydia with urogenital chlamydia in women visit a STI clinic revealed by routine universal testing in an observational study; a

recommendation towards a better anorectal chlamydia control in women. *BMC Infectious Disease*, v. 14, p. 274-281, 2014.

VICKERMAN, P. *et al.* Sensitivity requirements for the point of care diagnosis of CT and *Neisseria gonorrhoeae* in women. *Sexually transmitted infections*, v. 79, n.5 p. 363-7. 2003.

VRANIC, S. M. CT Infections of the Adults. In: MALLA, N. *Sexually Transmitted Infections*. Ed. Intech, p. 31-46, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/sexually-transmitted-infections/CT-infections-of-theadults>>. Acesso: <em abril de 2015>.

WAGENLEHNER, F. M.; NABER, K. G.; WEIDNER, W. Chlamydial infections and prostatitis in men. *BJU International*, v. 97, n. 4, p. 687–90, 2006.

WALKER, J. *et al.* CT incidence and re-infection among young women—behavioural and microbiological characteristics. *Plos One*, v. 7, n. 5, e37778, 2012.

WALLIN, K. L. *et al.* A population-based prospective study of CT infection and cervical carcinoma. *International journal of cancer*, v. 101, p. 371–374, 2002.

WARD, M. E. Chlamydial classification, development and structure. *British Medical Bulletin*, v. 39, p. 109–115, 1983.

WHILEY, D. M., TAPSALL, J. W., SLOOTS, T. P. Nucleic acid amplification testing for *Neisseria gonorrhoeae*: an ongoing challenge. *J Mol Diagn*. v. 8, p. 3–15, 2006.

WIRA, C. R. *et al.* Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunological Reviews*, v. 206, p. 306-335, 2005.

WISE, M. R.; SADLER, L.; EKEROMA, A. CT screening in pregnancy in New Zealand: translation of national guidelines into practice. *Journal of Primary Health Care*, v. 7, n. 1, p. 65-70, mar. 2015.

WOOD, H. Tryptophan metabolism in Chlamydiae. In Chlamydia Genomics and Pathogenesis. P.M. Bavoil & P.B. Wyrick, Eds.: Horizon Biosciences. Wymondham, Norfolk. 2011. 157–167.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections. CT, *Neisseria gonorrhoeae*, syphilis and Trichomonas vaginalis: methods and results used by WHO to generate 2005 estimates. 2005 WHO, Geneva, Switzerland. http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241502450_eng.pdf.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). SDI is promoting the development and evaluation of diagnostics that are ASSURED. Sexually Transmitted Disease Diagnostics Initiative. Geneva, Switzerland: WHO, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Sexually transmitted and other reproductive tract infections: A guide to essential practice. 2005b. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241592656.pdf>. Acesso em maio de 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Sexually Transmitted Diseases: CT. Disponível em: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_std/en/index1.html.. Acesso em: 20 outubro de 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Sexually transmitted infections [Internet]. Fact Sheet 110. 2007 [cited 2008 May 28]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/>

WYRICK, P. B. CT persistence in vitro: an overview. J Infect Dis. 2010; v. 201, n. 2. p. S88–95.

XIA, Q-F. *et al.* Development of a novel quantitative real-time assay using duplex scorpion primer for detection of CT. Experimental and Molecular Pathology, v. 83, p. 119-124, 2007.

YEUNG, E. *et al.* STI testing in emergency contraceptive consultations. British Journal of General Practice, v.65, p. 63, 2015.

ZHAO, K., QIU, F., CHEN, G. Building a web-based tool to support clinical decisions in the control of CT and *Neisseria gonorrhoeae* infections. BMC Proceedings, v. 7(Suppl 7): S11 14-16, 2013

ZHAO, K. *et al.* Optimization Model and Algorithm Help to Screen and Treat Sexually Transmitted Diseases. International Journal of Computational Models and Algorithms in Medicine, v. 1, n. 4, p. 1-18, 2010.

ANEXO 1 – Questionário

Curso de graduação na UFSC:		
Você é sexualmente ativa?	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Apresenta/apresentou corrimento vaginal no último mês?	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Sente dor durante o ato sexual?	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Quantos parceiros(as) sexuais já teve até hoje?	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> mais de 5
Possui mais de um(a) parceiro(a) sexual atualmente?	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Usa proteção em todas as suas práticas sexuais?	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Com quantos anos iniciou sua atividade sexual	Aos <input type="text"/> anos de idade	
Já teve um diagnóstico anterior positivo para Clamídia?	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Se respondeu sim à pergunta anterior, continua a sentir os sintomas após o tratamento?	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Já teve um diagnóstico anterior positivo para algum microrganismo que cause infecção vaginal (Candidíase, gardnerella, gonorréia, HPV e outros)?	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Se conseguir se lembrar, escreva para qual infecção você já se tratou		
Se respondeu sim à pergunta anterior, continuou a sentir os sintomas após o tratamento?	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Já apresentou algum exame preventivo de Papanicolaou alterado?	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não

<p>Ingestão Alcoólica</p> <p>abstêmia – aquela que nunca ingere bebida alcóolica;</p> <p>moderada - aquela que bebe antes das refeições, ou ao fim do dia, não se embriaga e não apresenta dependência psíquica ou física pelo álcool;</p> <p>excessiva - a distribuição de ingestão em maior quantidade, chega até à embriaguez; procura momento de euforia artificialmente através do álcool para mudar um estado de ânimo depressivo, apresenta dependência psíquica pelo álcool;</p> <p>adicta - aquela que apresenta dependência psíquica, cultural e física, a distribuição da ingestão é maior do que nos grupos anteriores e apresentam manifestações de abstinência ou síndrome de privação (cefaleia, tremores de extremidades, incapacidade de deter-se, incapacidade de abster-se, insônia).</p>	<p>() sim</p> <p>Escolha conforme a explicação ao lado:</p> <p>() moderada</p> <p>() excessiva</p> <p>() adicta</p>	<p>() não (abstêmia)</p>
<p>Fuma cigarro (tabaco)</p>	<p>() sim</p>	<p>() não</p>